

DOCKET NO.: 263989US0PCT

**IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE**

IN RE APPLICATION OF: Virginie LOUVAIN, et al.

SERIAL NO.: NEW U.S. PCT APPLICATION

FILED: HEREWITH

INTERNATIONAL APPLICATION NO.: PCT/EP03/07793

INTERNATIONAL FILING DATE: June 30, 2003

FOR: THROMBIN-CLEAVABLE FACTOR X ANALOGUES

**REQUEST FOR PRIORITY UNDER 35 U.S.C. 119  
AND THE INTERNATIONAL CONVENTION**

Commissioner for Patents  
Alexandria, Virginia 22313

Sir:

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicant claims as priority:

<u>COUNTRY</u>	<u>APPLICATION NO</u>	<u>DAY/MONTH/YEAR</u>
France	02 08299	03 July 2002

Certified copies of the corresponding Convention application(s) were submitted to the International Bureau in PCT Application No. PCT/EP03/07793. Receipt of the certified copy(s) by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.

Respectfully submitted,  
OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,  
MAIER & NEUSTADT, P.C.



\_\_\_\_\_  
Norman F. Oblon  
Attorney of Record  
Registration No. 24,618  
Surinder Sachar  
Registration No. 34,423

Customer Number

22850

(703) 413-3000

Fax No. (703) 413-2220  
(OSMMN 08/03)

**PRIORITY  
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



REC'D 05 SEP 2003

WIPO PCT

**BREVET D'INVENTION**

**CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION**

**COPIE OFFICIELLE**

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 19 AOUT 2003

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE



INSTITUT NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE  
26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08  
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

# BREVET D'INVENTION

## CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

INPI  
N° 11354\*02



## REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

page 1/2

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 540 CP W / 010801

<b>REMISSION</b> <b>REMISSÉE</b> <b>DU</b> <b>2002</b> <b>DATE</b> <b>75 INPI PARIS</b> <b>LIEU</b> <b>0208299</b> <b>N° D'ENREGISTREMENT</b> <b>NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI</b> <b>DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE</b> <b>PAR L'INPI</b> <b>- 3 JUIL. 2002</b>		<b>1</b> <b>NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE</b> <b>À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE</b>  <b>CABINET ORES</b>  <b>6, avenue de Messine</b>  <b>75008 PARIS</b>
<b>Vos références pour ce dossier</b> <i>( facultatif )</i> <b>MJPbv598/68FR</b>		
<b>Confirmation d'un dépôt par télécopie</b>		<input type="checkbox"/> <b>N° attribué par l'INPI à la télécopie</b>
<b>2</b> <b>NATURE DE LA DEMANDE</b>  <input checked="" type="checkbox"/> <b>Demande de brevet</b> <input type="checkbox"/> <b>Demande de certificat d'utilité</b>		<input type="checkbox"/> <b>Cochez l'une des 4 cases suivantes</b>
 <input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>		
<b>Demande divisionnaire</b>  <i>Demande de brevet initiale</i>  <i>ou demande de certificat d'utilité initiale</i>  <b>Transformation d'une demande de brevet européen</b> <i>Demande de brevet initiale</i>		<input type="checkbox"/>  <b>N°</b> _____ <b>Date</b> _____  <b>N°</b> _____ <b>Date</b> _____  <input type="checkbox"/>  <b>N°</b> _____ <b>Date</b> _____
<b>3</b> <b>TITRE DE L'INVENTION</b> (200 caractères ou espaces maximum)		ANALOGUES DE FACTEUR X CLIVABLES PAR LA THROMBINE.
<b>4</b> <b>DÉCLARATION DE PRIORITÉ</b> <b>OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE</b> <b>LA DATE DE DÉPÔT D'UNE</b> <b>DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE</b>		<input type="checkbox"/> <b>Pays ou organisation</b> <b>Date</b> _____ <b>N°</b>  <input type="checkbox"/> <b>Pays ou organisation</b> <b>Date</b> _____ <b>N°</b>  <input type="checkbox"/> <b>Pays ou organisation</b> <b>Date</b> _____ <b>N°</b>  <input type="checkbox"/> <b>S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé « Suite »</b>
<b>5</b> <b>DEMANDEUR</b> (Cochez l'une des 2 cases)		<input checked="" type="checkbox"/> <b>Personne morale</b> <input type="checkbox"/> <b>Personne physique</b>
<b>Nom</b> <b>ou dénomination sociale</b>  <b>Prénoms</b>  <b>Forme juridique</b>  <b>N° SIREN</b>  <b>Code APE-NAF</b>  <b>Domicile</b> <b>Rue</b>  <b>ou</b> <b>siège</b> <b>Code postal et ville</b>  <b>Nationalité</b>  <b>N° de téléphone</b> <i>( facultatif )</i>  <b>Adresse électronique</b> <i>( facultatif )</i>		<b>INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE</b> <b>(INSERM)</b>  <b>Etablissement public</b>  <input type="text"/>  <b>101, rue de Tolbiac</b>  <b>17 5 0 1 31 PARIS</b>  <b>Pays</b>  <b>FRANCE</b> <b>Française</b>  <b>N° de télécopie</b> <i>( facultatif )</i>  <input type="checkbox"/> <b>S'il y a plus d'un demandeur, cochez la case et utilisez l'imprimé « Suite »</b>

Remplir impérativement la 2<sup>me</sup> page

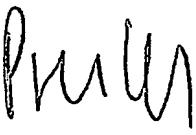
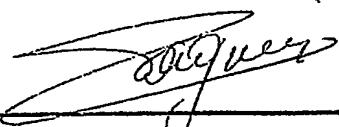
**BREVET D'INVENTION  
CERTIFICAT D'UTILITÉ**

**REQUÊTE EN DÉLIVRANCE**  
page 2/2

**BR2**

REMISSÉ DES PIÈCES		Réervé à l'INPI
DATE	03 JUIL 2002	
LIEU	75 INPI PARIS	
N° D'ENREGISTREMENT	0208299	
NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI		

DB 540 28 W / 010801

<b>Vos références pour ce dossier :</b> (facultatif)		MJPbv598/68FR
<b>1 MANDATAIRE (s'il y a lieu)</b>		
Nom		VIALLE-PRESLES
Prénom		Marie José
Cabinet ou Société		CABINET ORES
N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel		
Adresse	Rue	6 avenue de Messine
	Code postal et ville	75008 PARIS
	Pays	FRANCE
N° de téléphone (facultatif)		01.45.62.75.00
N° de télécopie (facultatif)		01.45.62.04.86
Adresse électronique (facultatif)		ores@cabinet-ores.com
<b>2 INVENTEUR (S)</b>		
Les demandeurs et les inventeurs sont les mêmes personnes		<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'inventeur(s)
<b>3 RAPPORT DE RECHERCHE</b>		
Établissement immédiat ou établissement différé		Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation) <input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Paiement échelonné de la redevance (en deux versements)		Uniquement pour les personnes physiques effectuant elles-mêmes leur propre dépôt <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non
<b>4 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES</b>		Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requise pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition) <input type="checkbox"/> Obtenue antérieurement à ce dépôt pour cette invention (joindre une copie de la décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence) : AG _____
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes		
<b>5 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)</b> Paris, le 3 juillet 2002		
VIALLE-PRESLES Marie José (n° 93-2009)		<b>VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI</b> 

La présente invention est relative à des dérivés de Facteur X clivables par la thrombine, et à leurs utilisations thérapeutiques.

La coagulation du sang résulte d'une cascade de réactions enzymatiques, dont l'étape ultime est la génération de thrombine, qui induit la formation d'un caillot à même de colmater la brèche vasculaire. La plupart de ces réactions impliquent l'activation protéolytique de zymogènes inactifs en sérine-protéases actives.

10 Cette cascade de réactions est traditionnellement divisée en deux voies dites : « voie intrinsèque » et : « voie du facteur tissulaire », ou « voie extrinsèque ».

15 Le processus de coagulation par la voie intrinsèque est initié par le contact du sang avec le tissu sous-endothélial. Ce contact entraîne l'activation du facteur XII (FXII) en facteur FXIIa, qui catalyse ensuite l'activation du facteur XI (FXI) en facteur XIa (FXIa), qui lui même active le facteur IX (FIX) en facteur IXa. Ce dernier se lie à son cofacteur, le facteur VIIIa (FVIIIa) 20 pour former le complexe tenase. Ce complexe clive avec une grande efficacité le facteur X (FX) pour produire du facteur X activé (FXa).

25 Le processus de coagulation par la voie extrinsèque est initié par le facteur tissulaire (TF), mis en contact du sang à l'occasion de la formation d'une brèche vasculaire. Ce facteur tissulaire se lie au facteur VII activé (FVIIa) présent en petite quantité dans le sang. Le complexe FVIIa-TF ainsi formé peut activer les facteurs IX et X.

30 La voie intrinsèque et la voie extrinsèque convergent ainsi vers l'activation du facteur X en facteur Xa, qui constitue une des enzymes clés de la coagulation.

35 Le facteur X est synthétisé par les hépatocytes sous forme d'un précurseur de 448 acides aminés, comprenant, de l'extrémité N-terminale vers l'extrémité C-terminale : un peptide signal, un propeptide, un domaine "Gla", deux domaines "EGF" (pour Epidermal Growth Factor) de structure

similaire à celle du facteur de croissance épidermique, un peptide d'activation, et un domaine catalytique de type sérine-protéase. Les modifications post-traductionnelles du facteur X sont particulièrement complexes : outre l'excision 5 du peptide signal et du propeptide, elles incluent la carboxylation des 11 glutamates du domaine "Gla" en  $\gamma$ -carboxyglutamates, l'excision du tripeptide Arg<sub>180</sub>-Lys<sub>181</sub>-Arg<sub>182</sub> (la numérotation fait référence au produit de traduction de l'ADNC du facteur X) séparant le second domaine 10 EGF du peptide d'activation, la  $\beta$ -hydroxylation du résidu Asp<sub>103</sub> du domaine EGF 1 en  $\beta$ -hydroxy aspartate, et au moins cinq glycosylations, dont quatre sur le peptide d'activation.

Le facteur X mature circulant dans le plasma est donc constitué de deux chaînes polypeptidiques reliées par un 15 pont disulfure (Cys<sub>172</sub>-Cys<sub>342</sub>) : la chaîne "légère" de 139 acides aminés est composée du domaine Gla et des deux EGF ; la chaîne "lourde" de 306 acides aminés est composée du peptide d'activation accolé au domaine catalytique.

L'activation du facteur X en sérine-protéase 20 nécessite un clivage protéolytique entre le peptide d'activation et le domaine catalytique. Le complexe ténase, ainsi que le complexe FVIIa-TF effectuent ce clivage entre les résidus Arg<sub>234</sub> et Ile<sub>235</sub>.

Le facteur X activé peut en outre effectuer un 25 clivage auto-catalytique qui libère lentement un petit fragment à l'extrémité C-terminale de sa chaîne lourde. On distingue ainsi les facteurs Xa  $\alpha$  et  $\beta$  selon que ce peptide C-terminal est présent ou non. L'activité catalytique de ces 30 2 formes du facteur Xa est toutefois identique (JESTY et al., J. Biol. Chem., 250, 4497-4504, 1975) ; en conséquence, et sauf précision contraire, dans l'exposé de la présente invention, le terme « facteur Xa » désigne indifféremment l'une ou l'autre de ces deux formes.

La liaison du facteur Xa avec son cofacteur, le 35 facteur Va, forme le complexe prothrombinase, qui active la prothrombine en thrombine.

La thrombine est également une enzyme essentielle de la coagulation, et de l'hémostase en général; c'est une

sérine-protéase multifonctionnelle. Elle induit l'agrégation des plaquettes en clivant son récepteur à leur surface, et transforme le fibrinogène circulant en caillot de fibrine insoluble. Ce caillot, en consolidant le thrombus plaquettaire déjà formé, obstrue la brèche vasculaire, et permet ainsi l'arrêt du saignement.

La thrombine peut également activer les facteurs V et VIII, respectivement cofacteurs des complexes tenase et prothrombinase, ainsi que le facteur XI (FXI), ce qui entraîne l'amplification des réactions conduisant à sa formation, où interviennent ces facteurs.

La Figure 1 schématise les principales réactions enzymatiques de la coagulation par la voie extrinsèque ou par la voie intrinsèque, ainsi que le mécanisme d'auto-amplification de la formation de thrombine (représenté par des flèches en pointillé).

Un déficit qualitatif ou quantitatif en l'un des facteurs impliqués dans la coagulation entraîne des manifestations thrombotiques ou hémorragiques souvent sévères, pouvant mettre en jeu le pronostic vital. Dans ce cadre, on citera notamment les hémophilie A et B, résultant respectivement d'un déficit en facteur VIII ou en facteur IX.

Les hémophilie A et B sont des coagulopathies de type hémorragique, graves et assez fréquentes : leur incidence est d'environ 1 cas pour 10 000 naissances mâles pour l'hémophilie A, et d'un cas pour 30 000 naissances mâles pour l'hémophilie B.

Sur le plan clinique ces deux pathologies ne se distinguent pas : dans les deux cas, c'est le complexe tenase résultant de l'association du facteur VIII avec le facteur IX qui est affecté. Il en résulte une production insuffisante de facteur X activé, et en conséquence de thrombine.

Ce déficit en thrombine entraîne non seulement la diminution de la formation de fibrine, mais aussi celle de l'auto-amplification de la production de thrombine.

Les traitements de l'hémophilie proposés à l'heure actuelle sont soit des traitements de type substitutif, visant à rétablir la fonction du complexe

tenase, soit des traitements basés sur l'utilisation d'une ou plusieurs molécules qui permettraient de court-circuiter ce complexe tenase (HEDNER, Thromb. Haemost., 82, 531-539, 1999).

5 Le traitement substitutif consiste à administrer le facteur VIII ou IX déficient. C'est le seul traitement disponible à ce jour qui permette de rétablir correctement, outre la formation de fibrine, l'auto-amplification de la génération de thrombine.

10 Le principal inconvénient de ce traitement réside dans l'antigénicité potentielle de la molécule injectée, qui peut être perçue comme étrangère par le système immunitaire du receveur. Le développement d'allo-anticorps neutralisants dirigés contre le facteur utilisé est une complication grave 15 du traitement substitutif, qui le rend peu à peu inefficace.

Trois approches ont été proposées pour court-circuiter le complexe tenase :

20 - l'injection de mélanges de facteurs de la coagulation dits "vitamine K-dépendants", comprenant notamment de la prothrombine et des facteurs VII, IX et X, les facteurs VII et X étant partiellement sous forme activée. Ce traitement induit toutefois des effets secondaires rares, mais graves : chocs anaphylactiques et accidents 25 thrombotiques (infarctus du myocarde, coagulation intravasculaire disséminée), qui s'expliquent par une action non localisée à la lésion vasculaire. En outre ce traitement ne rétablit d'auto-amplification de la génération de thrombine que dans le cas des hémophiles B.

30 - l'injection massive de facteur VII activé qui, en présence de facteur tissulaire, active le facteur X indépendamment du complexe tenase. Le facteur VII activé présente l'avantage d'avoir une action localisée au niveau de la brèche vasculaire où se forme le complexe avec le facteur tissulaire. Son efficacité dans le traitement de l'hémophilie 35 pourrait aussi s'expliquer par un mécanisme indépendant du facteur tissulaire, qui utiliserait les phospholipides anioniques exposés par les plaquettes activées (HOFFMAN et al., Blood Coag. Fibrinolysis, 9 (suppl), S61-65, 1998). Les

principaux inconvénients de l'utilisation de facteur VII activé sont sa demi-vie plasmatique très courte (inférieure à trois heures), qui nécessite de l'administrer en quantités importantes, ce qui rend le traitement très onéreux. En 5 outre, le facteur VII activé n'induit pas d'auto-amplification de la génération de thrombine. La quantité de thrombine générée dans un plasma d'hémophile après l'addition d'une dose thérapeutique de facteur VII activé reste bien inférieure à celle générée dans un plasma normal (BUTENAS et 10 al., *Blood*, 99, 923-930, 2002).

- l'administration de facteur X dont l'activité n'est libérée que lentement dans le plasma ; dans ce cadre, trois types d'administration ont été proposés : l'administration de facteur X activé en combinaison avec des 15 vésicules phospholipidiques (NI et al., *Thromb. Haemost.*, 67, 264-271, 1992) ; l'administration de facteur X activé mais inhibé réversiblement, par exemple par acétylation de la sérine du site actif, et capable de se ré-activer lentement dans le plasma par déacylation progressive (WOLF et al., 20 *Blood*, 86, 4153-4157, 1995; LIN et al., *Thromb. Res.*, 88, 365-372, 1997) ; l'administration de facteur X sous forme de zymogène pouvant s'activer dans le plasma indépendamment du complexe tenase. Cette dernière approche met en œuvre des 25 analogues de facteur X dont le site de clivage par le complexe tenase est remplacé par un site de clivage par une autre protéase.

HIMMELSPACH et al. (*Thromb. Res.*, 97, 51-67 2000) décrivent ainsi des analogues de facteur X dont le site d'activation est remplacé par un site de clivage pour la 30 furine. Une fois injecté, ce zymogène peut se transformer lentement et en continu en facteur Xa.

La Demande PCT WO 98/38317 propose la construction de divers analogues de facteur X dans lesquels le site natif d'activation est remplacé par un site de clivage par une autre protéase choisie parmi le facteur XIa, la thrombine, le facteur XIIa, la kallikréine, le facteur Xa, ou la furine. La demande PCT WO 01/10896 propose le 35

remplacement du site natif d'activation par le complexe tenase par un site de clivage par le facteur XIa.

L'avantage principal de l'utilisation d'analogues de facteur X réside dans la demi-vie plasmatique de ces analogues, similaire à celle du facteur X (48 heures), et donc beaucoup plus longue que celle du facteur X activé (inférieure à 1 minute). Les inconvénients potentiels de ces analogues résultent de la difficulté de contrôler leurs effets : la génération de facteur X activé se produit en continu, sans régulation et sans localisation au niveau de la brèche vasculaire. En outre, ces analogues ne permettent pas d'induire l'amplification de la génération de thrombine.

Il apparaît donc souhaitable de disposer d'autres analogues de facteur X qui ne présenteraient pas ces inconvénients. Dans ce but, les Inventeurs ont recherché des dérivés de facteur X activables par la thrombine, ce qui permettrait non seulement de court-circuiter les étapes défaillantes de la cascade de la coagulation, et notamment le complexe tenase, mais également de rétablir une auto-amplification de la génération de thrombine, selon le mécanisme illustré par la Figure 2. La forme activée de ce dérivé du facteur X (FXa\*) serait en effet capable (en association avec le facteur V activé) de former un complexe prothrombinase fonctionnel et donc d'activer la prothrombine en thrombine. En retour, la thrombine activerait de nouvelles molécules de dérivé du facteur X.

Physiologiquement, la thrombine n'active pas le facteur X. En effet, l'efficacité du clivage est conditionnée par la nature des acides aminés encadrant le site de clivage, et notamment par les résidus  $P_3-P_2-P_1-P_1'-P_2'-P_3'$  du site d'activation (le clivage se produisant entre les résidus  $P_1$  et  $P_1'$ ). Or, dans le cas du facteur X, la séquence Leu-Thr-Arg-Ile-Val-Gly (LTR-IVG) du site d'activation est très éloignée des séquences Met-Pro-Arg-Ser-Phe-Arg (MPR-SFR) ou Val-Pro-Arg-Ser-Phe-Arg (VPR-SFR) qui sont particulièrement favorables pour un clivage par la thrombine (MARQUE et al., J. Biol. Chem., 275, 809-816, 2000; BIANCHINI et al., J. Biol. Chem., 277, 20527-20534, 2002).

Les résidus  $P_3$  à  $P_1$  qui précèdent le site de clivage ne sont pas impliqués dans l'activité catalytique du facteur X après activation : ils font partie du peptide d'activation qui est relargué après clivage. Il n'en est pas de même pour les résidus  $P_1'$  à  $P_3'$  qui suivent immédiatement le site de clivage : comme dans toutes les sérine-protéases, les résidus N-terminaux de la chaîne catalytique du facteur X activé sont impliqués dans l'activité enzymatique. Le résidu  $P_1'$  joue en particulier un rôle fondamental dans le mécanisme catalytique de l'enzyme.

La substitution de la séquence LTR-IVG du site d'activation du facteur X par la séquence VPR-SFR permettrait de multiplier par  $10^5$  la vitesse de clivage du facteur X par la thrombine. Cependant, cette substitution risque d'être préjudiciable à l'activité enzymatique du facteur Xa. Il n'est en effet pas possible de prédire quelle serait l'activité enzymatique d'un analogue de facteur X activé dont la chaîne lourde débuterait par un résidu autre que l'isoleucine.

La Demande PCT WO 98/38317 décrit un analogue de facteur X dans lequel la séquence LTR-IVG du site d'activation natif est remplacée par la séquence Thr-Arg-Arg-Ser-Val-Gly (TRR-SVG), et qui est présenté comme potentiellement clivable par la thrombine. Cependant, aucune indication n'est donnée sur le clivage effectif de ce zymogène par la thrombine, et encore moins sur l'activité catalytique de l'analogue de facteur Xa qui résulterait de ce clivage.

Les Inventeurs ont testé différentes substitutions aux positions  $P_3-P_2-P_1-P_1'-P_2'-P_3'$  du site d'activation natif du facteur X, afin d'étudier les effets de ces substitutions, d'une part sur le clivage par la thrombine, et d'autre part sur l'activité enzymatique de l'analogue de facteur Xa qui en résulte.

Ils ont ainsi constaté que la substitution, aux positions  $P_2-P_1-P_1'$ , de la séquence TR-I par la séquence PR-A permettait d'obtenir des analogues de facteur X clivables de manière efficace par la thrombine, et dont le clivage

générait un analogue de facteur Xa possédant une activité catalytique qui, bien que réduite, était similaire à celle de son homologue non muté, et compatible avec une fonction physiologique normale ; de plus, cette diminution de l'activité catalytique est compensée par une augmentation de la demi-vie par rapport à celle du facteur Xa natif. Cette augmentation de la demi-vie résulte d'une meilleure résistance aux serpines (inhibiteurs plasmatiques des sérines protéases), et notamment à l'antithrombine.

La présente invention a en conséquence pour objet un analogue de facteur X dans lequel la séquence Thr-Arg-Ile du site d'activation du facteur X natif est remplacée par une séquence clivable par la thrombine, caractérisé en ce que ladite séquence clivable par la thrombine est la séquence Pro-Arg-Ala.

La présente invention a également pour objet tout analogue de facteur Xa pouvant être obtenu par clivage par la thrombine d'un analogue de facteur X conforme à l'invention.

Le terme « analogue du facteur X » désigne ici aussi bien la molécule de facteur X mature que son précurseur intra-cellulaire ; le terme « analogue du facteur Xa » désigne la molécule sous forme activée,  $\alpha$  ou  $\beta$ .

En ce qui concerne les substitutions aux positions  $P_3$ ,  $P_2'$  et  $P_3'$  du site d'activation, elles ont une influence moindre sur l'efficacité du clivage par la thrombine, et sur l'activité enzymatique de l'analogue de facteur Xa obtenu que celles effectuées aux positions  $P_2$ ,  $P_1$ , ou  $P_1'$ .

Ainsi, en  $P_3$ , le résidu Leu du facteur X natif peut être conservé, ou substitué par n'importe quel acide aminé, à l'exception de Pro, Asp, et Glu ; en  $P_2'$ , le résidu Val du facteur X natif peut être conservé, ou substitué par un acide aminé choisi de préférence parmi Ile, Leu, ou Phe ; en  $P_3'$ , le résidu Gly du facteur X natif peut être conservé, ou substitué par un acide aminé choisi de préférence parmi Asn ou His.

Optionnellement, on peut combiner les modifications du site d'activation spécifiques aux analogues

de facteur X et de facteur Xa conformes à l'invention avec d'autres modifications concernant des domaines différents du facteur X ou du facteur Xa et permettant d'améliorer certaines de leurs propriétés. Ainsi, on peut par exemple 5 remplacer le propeptide du facteur X natif par celui de la prothrombine, afin d'obtenir un meilleur rendement en protéine mature  $\gamma$ -carboxylée, comme décrit par CAMIRE et al. (Biochemistry, 39, 14322-14329, 2000).

La présente invention a également pour objet des 10 molécules d'acide nucléique codant pour des analogues de facteur X conformes à l'invention.

Ces molécules d'acide nucléique peuvent être obtenues par des méthodes classiques bien connues de l'homme de l'art, notamment par mutagenèse dirigée d'une molécule 15 d'acide nucléique codant pour le facteur X natif.

La présente invention englobe également les cassettes d'expression, comprenant une molécule d'acide nucléique conforme à l'invention associée à des éléments appropriés de contrôle de la transcription (notamment 20 promoteur, et éventuellement terminateur) et éventuellement de la traduction, ainsi que les vecteurs recombinants dans lesquels est insérée une molécule d'acide nucléique conforme à l'invention. Ces vecteurs recombinants peuvent être par exemple des vecteurs de clonage, des vecteurs d'expression, 25 ou des vecteurs de transfert de gènes utilisables en thérapie génique.

La présente invention a en outre pour objet des cellules-hôtes procaryotes ou eucaryotes génétiquement transformées par au moins une molécule d'acide nucléique 30 selon l'invention. De préférence, pour l'expression et la production des analogues de facteur X conformes à l'invention, on choisira des cellules eucaryotes, par exemple des cellules de mammifères.

La construction de vecteurs conformes à 35 l'invention, et la transformation des cellules-hôtes peuvent être effectuées par les techniques classiques de biologie moléculaire.

La présente invention englobe aussi des animaux et en particulier des mammifères transgéniques non-humains, hébergeant au moins un transgène comprenant une cassette d'expression conforme à l'invention. Ces mammifères transgéniques peuvent être utilisés par exemple pour la production d'analogues de facteur X conformes à l'invention, de façon similaire à ce qui a déjà été proposé pour la production d'autres protéines d'intérêt thérapeutique (BRINK et al., *Theriogenology*, 53, 139-148 2000).

Les analogues de facteur X conformes à l'invention peuvent être obtenus par exemple par mise en culture de cellules génétiquement transformées conformes à l'invention et récupération, à partir de la culture, de l'analogue exprimé par lesdites cellules. Ils peuvent ensuite, si nécessaire, être purifiés par des procédures classiques, connues en elles-mêmes de l'homme de l'art, par exemple par précipitation fractionnée, notamment précipitation au sulfate d'ammonium, électrophorèse, filtration sur gel, chromatographie d'affinité, etc.

La présente invention a également pour objet l'utilisation d'analogues de facteur X ou d'analogues de facteur Xa conformes à l'invention, ou des molécules d'acide nucléique codant pour ces analogues, pour l'obtention de médicaments procoagulants.

Des médicaments obtenus à partir d'analogues de facteur X ou de facteur Xa conformes à l'invention sont utilisables dans le cadre de la prévention ou du traitement de coagulopathies de type hémorragique, découlant notamment d'un déficit en facteur VIII, IX, ou XI. Il peut s'agir en particulier des hémophilie A ou B, compliquées ou non de la présence d'inhibiteurs (allo-anticorps neutralisants dirigés contre le facteur VIII ou IX habituellement utilisé pour le traitement); il peut s'agir également d'hémophilie acquise résultant de l'apparition d'auto-anticorps associée à une autre pathologie (maladie auto-immune, cancer, syndrome lymphoprolifératif, affection idiopathique, etc.)

Des molécules d'acide nucléique selon l'invention peuvent avantageusement être incorporées dans des médicaments

utilisables en thérapie génique. Les vecteurs habituellement utilisés en thérapie génique, tels que des vecteurs viraux (par exemple, un vecteur de type adénovirus ou rétrovirus), des liposomes, etc. sont utilisables pour l'obtention de 5 médicaments conformes à l'invention.

Les analogues de facteur Xa conformes à l'invention possèdent, en dehors du complexe prothrombinase, une activité catalytique beaucoup plus faible que celle du facteur Xa natif. Toutefois, au sein du complexe 10 prothrombinase (c'est-à-dire dans les conditions physiologiques), la diminution de leur activité par rapport au facteur Xa natif est beaucoup moindre, et ils sont effectivement capables de corriger les effets d'une déplétion 15 en facteur VIII ou IX. En outre, du fait de leur résistance importante à l'antithrombine, les analogues de facteur Xa conformes à l'invention présentent l'avantage d'avoir une demi-vie plus longue, qui compense leur plus faible activité. Bien que beaucoup plus lente, l'inhibition par 20 l'antithrombine (qui est proportionnelle à l'activité catalytique) demeure, ce qui permet de conserver un mécanisme d'autorégulation similaire à celui du facteur Xa natif.

En outre, l'action des analogues de facteur Xa conformes à l'invention demeure localisée au niveau de la brèche vasculaire, puisque, comme le montre la Figure 2, la 25 cascade enzymatique dans laquelle interviennent ces analogues est déclenchée par le facteur tissulaire. Enfin comme le montre également la Figure 2, la mise en œuvre des analogues de facteur X conformes à l'invention permet de rétablir l'auto-amplification de la génération de thrombine.

Il en résulte globalement un effet thérapeutique 30 mieux ciblé et plus aisé à contrôler que celui des analogues de facteur X ou de facteur Xa de l'art antérieur.

Les analogues de facteur X conformes à l'invention peuvent par exemple être utilisés à des 35 concentrations plasmatiques de l'ordre de 0,1 à 0,5  $\mu\text{M}$  soit 5 à 25 mg/L. Ces concentrations peuvent être obtenues par l'administration de doses voisines de celles qui sont

utilisées dans le cas des traitements par le facteur VIIa, mais avec une fréquence bien moindre.

La présente invention sera mieux comprise à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se 5 réfère à des exemples non-limitatifs de préparation et de caractérisation d'un analogue de facteur X conforme à l'invention.

**EXEMPLE 1 : CONSTRUCTION DE VECTEURS D'EXPRESSION D'ANALOGUES DU FACTEUR X**

10 Différents dérivés du facteur X humain ont été construits :

- un dérivé dénommé ci-après « FX-recombinant », ne différant du facteur X natif que par l'addition à son extrémité C-terminale, d'un peptide de 11 acides aminés 15 (EQKLISEEDLN) qui est reconnu par l'anticorps monoclonal 9E10 (PHARMINGEN, San Jose, USA) ; cette modification permet de faciliter la détection et la purification de la protéine exprimée ;

20 - un dérivé dénommé ci-après « GD-FX », qui diffère du dérivé « recombinant » en ce qu'il est en outre dépourvu de domaine Gla, ce qui permet d'augmenter la quantité de protéine recombinante exprimée, et en ce qu'il comprend à son extrémité N-terminale une séquence de 25 12 acides aminés (EDQVDPRLLIDGK), constituant un épitope reconnu par l'anticorps monoclonal HPC-4 (ROCHE DIAGNOSTIC, Meylan, France).

30 - les dérivés dénommés ci-après GDX-IVG, GDX-IFG, GDX-AVG, GDX-IFR, GDX-SVG, GDX-SFR, qui diffèrent du dérivé GD-FX par la modification d'un ou plusieurs des résidus en positions  $P_3$ ,  $P_2$ ,  $P_1$ ,  $P_1'$ ,  $P_2'$  ou  $P_3'$  du site d'activation.

Les résidus  $P_3$  à  $P_3'$  du site d'activation du facteur X normal isolé à partir de plasma (FX-plasmatique), et de chacun des dérivés ci-dessus sont indiqués dans le Tableau I.

TABLEAU I

	P <sub>3</sub>	P <sub>2</sub>	P <sub>1</sub>	P <sub>1'</sub>	P <sub>2'</sub>	P <sub>3'</sub>
FX-plasmatische	Leu	Thr	Arg	Ile	Val	Gly
FX-recombinant	Leu	Thr	Arg	Ile	Val	Gly
GD-FX	Leu	Thr	Arg	Ile	Val	Gly
GDX-IVG	Val	Pro	Arg	Ile	Val	Gly
GDX-IFG	Val	Pro	Arg	Ile	Phe	Gly
GDX-AVG	Val	Pro	Arg	Ala	Val	Gly
GDX-IFR	Val	Pro	Arg	Ile	Phe	Arg
GDX-SVG	Val	Pro	Arg	Ser	Val	Gly
GDX-SFR	Val	Pro	Arg	Ser	Phe	Arg

Les vecteurs d'expression utilisés pour la construction de ces dérivés sont obtenus à partir du vecteur pNUT-hGH (PALMITER et al., Science, 1983, 222, 809-814, 5 1983), par remplacement de la séquence codant pour l'hormone de croissance humaine (hGH) par la séquence codant pour le dérivé de facteur X souhaité.

#### Construction du vecteur pNUT-FX

Le vecteur dénommé "pNUT-FX" permet l'expression 10 en cellules eucaryotes du dérivé « FX-recombinant ».

L'ADNc complet du facteur X humain utilisé (1467 paires de bases) a été initialement cloné par MESSIER et al., (Gene, 99, 291-294, 1991), au niveau du site SalI du plasmide pBluescript KS(-).

15 Cet ADNc a été récupéré par amplification PCR à partir du vecteur pBluescript le contenant. Les amorceuses utilisées sont représentées dans le tableau II ci-dessous. La température de fusion utilisée (Th°) est indiquée dans la dernière colonne du tableau.

TABLEAU II

Amorce	Séquences (5'→3')	Th (°C)
1	ACGGGGATCCGCGATGGGGCGCCACTGCA	51
2	TCCCCCGGGGGATCAGTTCAGGTCTCGCTGATCAGCTCTGCTCCCTTAATGGAGAGGACGTTA	51

20 Les amorceuses 1 et 2 introduisent respectivement un site de restriction BamHI en 5' et un site XmaI en 3' de la séquence codant pour le facteur X. Par ailleurs, l'amorce 2 introduit juste avant le codon stop de l'ADNc du facteur X la séquence codant pour l'épitope reconnu par l'anticorps monoclonal 9E10.

Le protocole d'amplification est le suivant : l'amplification est réalisée dans un volume de 100 µl contenant 2 µg (7 nM) de plasmide pBluescript, 2 µM de

chacune des amores 1 et 2, 0,2 mM de chaque dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP ; AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH, Orsay, France), et 6 unités de Pfu DNA Polymérase (STRATAGENE) dans le tampon préconisé par le fabricant. L'amplification est 5 effectuée dans un DNA THERMAL CYCLER (modèle 480, PERKIN ELMER, Roissy, France) selon le programme suivant : une dénaturation initiale de 5 minutes à 95°C, suivie de 10 30 cycles comprenant chacun 45 secondes de dénaturation à 95°C, 45 secondes d'hybridation à une température au minimum inférieure de 4°C à celle de fusion des amores, et 3,5 minutes d'elongation à 72°C. L'amplification est terminée 15 par une incubation de 10 minutes à 72°C.

Le produit d'amplification est purifié par une extraction au phénol/chloroforme, et concentré par 20 précipitation à l'éthanol. Les extrémités sont ensuite rendues franches et phosphorylées par une incubation de 25 30 minutes à 37°C en présence de 5 unités de T<sub>4</sub> DNA polymérase (NEW ENGLAND BIOLABS, Beverly, MA, USA), de 10 unités de polynucléotide kinase T<sub>4</sub> (NEW ENGLAND BIOLABS) et de 0,3 mM de dNTP (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH). Le fragment d'intérêt est purifié à l'aide du « QIAquick Gel Extraction Kit » (QIAGEN, Courtaboeuf, France), après séparation en gel d'agarose standard à 1%, en suivant les 30 instructions du fabricant.

Parallèlement, 40 µg dans 140 µl (86 nM) d'un vecteur d'accueil (pBluescript, STRATAGENE) sont linéarisés par 400 unités d'EcoRV pendant 90 minutes à 37°C. Les extrémités du vecteur pBluescript linéarisé sont déphosphorylées par incubation de 60 minutes à 37°C en 35 présence de 50 unités de phosphatase alcaline d'intestin de veau (NEW ENGLAND BIOLABS) ; ce vecteur est ensuite purifié comme ci-dessus, à l'aide du « QIAquick Gel Extraction Kit », après séparation en agarose standard à 1%.

L'insert est introduit dans le vecteur d'accueil 40 par ligation, en incubant 10 nM de vecteur avec 20 nM d'insert en présence de 400 unités de T<sub>4</sub> DNA ligase (NEW ENGLAND BIOLABS) pendant 24 heures à température ambiante dans 10 µl du tampon recommandé par le fabricant.

Le plasmide résultant (pBluescript-FX) est amplifié dans la souche DH5 $\alpha$  de *E. coli* et purifié suivant les protocoles standard, décrits par SAMBROOK et al. (Molecular Cloning: A laboratory Manual. Cold Spring Harbor 5 Laboratory Press, 1989).

L'insert du plasmide pBluescript-FX est transféré dans le vecteur pNUT-hGH par échange de cassette, selon le protocole suivant :

Deux  $\mu$ g (4 nM) de pNUT-hGH sont digérés par 10 60 unités de BamHI pendant 2 heures à 37°C dans 100  $\mu$ l de mélange réactionnel. Le vecteur ainsi linéarisé est purifié par une extraction au phénol/chloroforme, suivie d'une précipitation à l'éthanol. Il est ensuite repris dans 10  $\mu$ l de Tris 10 mM pH 8,0 contenant 1 mM d'EDTA, et digéré par 15 30 unités de XmaI pendant 3 heures à 37°C.

Les deux fragments issus de cette deuxième digestion sont déphosphorylés, par une incubation d'une heure à 37°C en présence de 150 unités de phosphatase alcaline.

Le vecteur pNUT linéarisé est séparé de son 20 ancien insert (contenant la séquence codant pour l'hGH) par une électrophorèse en agarose standard à 1%, et purifié à l'aide du « QIAquick Gel Extraction Kit ».

Parallèlement, 130  $\mu$ g (1,3  $\mu$ M) de pBluescript-FX 25 sont digérés par 20 unités de BamHI pendant 1 heure à 37°C dans 30  $\mu$ l de mélange réactionnel. Le vecteur linéarisé est purifié par une extraction au phénol/chloroforme suivie d'une précipitation à l'éthanol. Il est ensuite repris dans 10  $\mu$ l de Tris 10 mM pH 8,0 contenant 1 mM d'EDTA, et digéré par 30 30 unités de XmaI pendant 3 heures à 37°C.

L'insert FX est séparé de son ancien vecteur par 30 une électrophorèse en agarose standard à 1%, et purifié à l'aide du « QIAquick Gel Extraction Kit ».

Le vecteur pNUT-FX est obtenu par ligation de l'insert FX dans le vecteur pNUT en présence de T<sub>4</sub> DNA 35 ligase, comme décrit ci-dessus.

#### Construction du vecteur pNUT-GDX

La présence d'un domaine "Gla" limite considérablement la synthèse d'une protéine recombinante dans

une cellule eucaryote. Son élimination permet de multiplier par cinq la quantité de protéine recombinante exprimée.

D'autre part, le domaine "Gla" du facteur X est nécessaire à son activité biologique, mais n'est pas indispensable pour l'activité protéolytique vis-à-vis de substrats qui n'interagissent qu'avec le sillon catalytique. La préparation de dérivés dépourvus du domaine "Gla" permet donc de déterminer rapidement l'effet de modifications des résidus jouxtant le site d'activation sur l'activité sérine-protéase.

Le vecteur pNUT-ETW (LE BONNIEC et al., J. Biol. Chem., 267, 6970-6976, 1992) exprime un dérivé de la prothrombine humaine dépourvu de son domaine "Gla", et fusionné en N-terminal au peptide signal du facteur V bovin et à une séquence de 12 acides aminés (EDQVDPRLIDGK), constituant un épitope reconnu par l'anticorps monoclonal HPC-4.

Pour construire le vecteur pNUT-GDX, l'ensemble peptide signal et domaine "Gla" du vecteur pNUT-FX a été substitué par l'ensemble peptide signal, propeptide et épitope HPC-4 du vecteur pNUT-ETW.

Les amorces utilisées pour amplifier les fragments des vecteurs pNUT-FX et pNUT-ETW sont représentées dans le tableau III ci-dessous. L'amplification PCR est effectuée comme décrit ci-dessus pour le vecteur pNUT-FX.

TABLEAU III

Amorces	Séquences (5' → 3')	Th (°C)
3	TATGCGTGGGCTGGAGCAACC	62
4	TTATTAGGACAAGGCTGGTGGG	62
5	CTTCCCACATCAATGAGCCGCGG	62
6	CCGGCGCTCATTGATGGGAAGGATGGCGACCAGTGTGAGACC	62

L'amplification du fragment issu de pNUT-ETW (qui inclut les sites BamHI et XmaI de pNUT, la séquence codant pour le peptide signal du facteur V et celle codant pour l'épitope reconnu par l'anticorps HPC-4) est faite avec les amorces 3 et 5); l'amplification du fragment issu de pNUT-FX (qui inclut la séquence codant pour les deux domaines EGF, le peptide d'activation, et le domaine sérine protéase du facteur X, ainsi que l'épitope reconnu par l'anticorps 9E10)

est faite avec les amorces 6 et 4. Les amorces 5 et 6 sont en partie complémentaires (l'amorce 6 introduit en 5' du premier EGF une partie de la séquence codant pour l'épitope reconnu par l'anticorps HPC-4), ce qui permet le raboutage des 5 fragments issus des deux PCR par PCR "Mega-primer" (HO et al., Gene, 15, 51-59, 1989) en présence des amorces 3 et 4. Le produit de cette PCR est digéré par 40 unités de XmaI (dans un volume de 400  $\mu$ l), et le fragment de restriction (avec un site XmaI à chaque extrémité) est purifié à l'aide 10 du QIAquick Gel Extraction Kit après séparation en gel d'agarose à 1%.

D'autre part, 6  $\mu$ g dans 140  $\mu$ l (12 nM) de vecteur pNUT-hGH sont digérés par 20 unités de XmaI, pendant 2 heures à 37°C. Le vecteur ainsi linéarisé est séparé de son ancien 15 insert (séquence codant pour hGH) par électrophorèse en agarose standard à 1%, et purifié à l'aide du QIAquick Gel Extraction Kit. Le vecteur sans insert (0,1  $\mu$ g dans 10  $\mu$ l, soit 2,7 nM) est recircularisé par ligation en présence de 400 unités de T<sub>4</sub> DNA ligase pendant 16 heures à température 20 ambiante.

Le vecteur pNUT recircularisé est amplifié dans la souche DH5 $\alpha$  de *E. coli* et purifié.

40  $\mu$ g dans 100  $\mu$ l, (soit 110 nM) du vecteur pNUT dépourvu d'insert sont linéarisés par 10 unités de XmaI 25 pendant 3 heures à 37° C, et ses extrémités sont déphosphorylées par incubation pendant 1 heure à 37° C en présence de 150 unités de phosphatase alcaline. Le vecteur pNUT ainsi préparé est isolé à l'aide du QIAquick Gel Extraction Kit, après séparation en gel d'agarose à 1%.

30 Le vecteur pNUT-GDX est obtenu par ligation du fragment issu de la PCR "Mega-primer" dans le vecteur pNUT en présence de T<sub>4</sub> DNA ligase, comme décrit ci-dessus, et sélection, sur la base des profils de restriction BamHI, XmaI, PstI ou EcoRI, des constructions contenant l'insert 35 dans la bonne orientation.

#### Mutagenèse dirigée du vecteur pNUT-GDX

Dans le facteur X natif (ainsi que dans le dérivé GDX-FX), la séquence des résidus P<sub>3</sub>-P<sub>2</sub>-P<sub>1</sub>-P<sub>1'</sub>-P<sub>2'</sub>-P<sub>3'</sub>

encadrant le site de clivage (le clivage s'effectuant entre  $P_1$  et  $P_1'$ ) est LTR-IVG.

5 Les six analogues du facteur X préparés : GDX-IVG, GDX-IFG, GDX-AVG, GDX-IFR, GDX-SVG, GDX-SFR ont respectivement pour séquence  $P_3-P_2-P_1-P_1'-P_2'-P_3'$  : VPR-IVG, VPR-IFG, VPR-IFR, VPR-AVG, VPR-SVG, et VPR-SFR.

10 Les vecteurs exprimant ces analogues de facteur X ont été préparés par mutagénèse du vecteur pNUT-GDX par une méthode dérivée de celle de JONES et al. (Nature, 344, 793-794, 1990).

Les séquences des amorces utilisées pour la mutagenèse du vecteur pNUT-GDX sont indiquées dans le Tableau IV.

15 L'amorce "sens" (s) s'hybride sur le brin non codant, et l'amorce "anti-sens" (a) s'hybride sur le brin codant.

TABLEAU IV

GDX-IVG (s)	AGGGGCGACAACAACGTGCCTAGGATCGTGGCGGCCAGGAATGCAAG
GDX-IVG (a)	CTTGCATTCCTGGCCGCCACGATCCTAGGCACGTTGTTGTCGCCCT
GDX-IFG (s)	AGGGGCGACAACAACGTGCCTAGGATCTCGGCGGCCAGGAATGCAAG
GDX-IFG (a)	CTTGCATTCCTGGCCGCCGAAGATCCTAGGCACGTTGTTGTCGCCCT
GDX-IFR (s)	AGGGGCGACAACAACGTGCCTAGGATCTCAGGGGCCAGGAATGCAAG
GDX-IFR (a)	CTTGCATTCCTGGCCCTGAAGATCCTAGGCACGTTGTTGTCGCCCT
GDX-SFR (s)	AGGGGCGACAACAACGTGCCTAGGAGCTTCAGGGGCCAGGAATGCAAG
GDX-SFR (a)	CTTGCATTCCTGGCCCTGAAGCTCCTAGGCACGTTGTTGTCGCCCT
GDX-SVG (s)	CAACGTGCCTAGGAGCGTGGCGGCCAGG
GDX-SVG (a)	CCTGGCCGCCACGCCTCTAGGCACGTTG
GDX-AVG (s)	CCTGAGAGGGCGACAACAACGTGCCTAGGGCGTGGCGGCCAGGAATGCAAGG
GDX-AVG (a)	CCTTGCATTCCTGGCCGCCACGGCCCTAGGCACGTTGTTGTCGCCCTCAGG

20 La mutagenèse est faite par PCR dans un volume de 50  $\mu$ l contenant 50 ng (10 nM) de pNUT-GDX comme matrice, 125 ng (70 nM) de chaque amorce (sens et anti-sens, voir tableau 4), un mélange équimolaire (0,5 mM) de chaque dNTP, et 2,5 unités de Pfu polymérase dans le tampon préconisé par le fabricant, à l'aide d'un DNA thermal cycler 480 (PERKIN ELMER). La PCR comprend une étape initiale de dénaturation à 95°C pendant 5 minutes, suivie de 16 cycles identiques qui se décomposent chacun en 45 secondes de dénaturation à 95°C, 60 secondes d'hybridation à 55°C, et 26 minutes d'elongation à 68°C. A l'issue de ces 16 cycles, le vecteur ayant servi de matrice est dégradé à 37°C pendant 60 minutes par 10 unités de DpnI.

Des bactéries DH5 $\alpha$  rendues compétentes par lavage à 4°C en 100 mM CaCl<sub>2</sub> sont transformés par 5 à 10  $\mu$ l du produit de la PCR digéré par DpnI ; les colonies ayant incorporé un plasmide viable sont sélectionnées, et 5 l'orientation et la séquence de l'insert sont vérifiées.

**EXEMPLE 2 : PRODUCTION DES DERIVES DU FACTEUR X EN CELLULES EUCHARYOTES :**

**Transfection des cellules BHK-21 :**

10 Les protéines recombinantes ont été exprimées dans des cellules de rein de hamster nouveau-nés (BHK-21) fournies par l'European Collection of Cell Cultures (Sofia-antipolis, France).

15 Les cellules BHK-21 sont cultivées en boîte de Pétri (diamètre 80 mm) dans une étuve à 37°C sous atmosphère de 5% de CO<sub>2</sub>, en milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) complet : (GIBCO BRL), supplémenté par 10% de sérum de veau foetal (GIBCO BRL), 2 mM de L-glutamine (GIBCO BRL), 100 unités/ml de pénicilline (GIBCO BRL), et 100  $\mu$ g/ml de streptomycine (GIBCO BRL). Lorsqu'elles atteignent une 20 confluence d'environ 80%, les cellules sont rincées 2 fois en tampon PBS (Phosphate Buffer Saline, GIBCO BRL) puis incubées à 37°C pendant 1 heure dans 4 ml d'OPTI-MEM (GIBCO BRL).

25 La transfection est réalisée en ajoutant 40 nM du vecteur d'expression du dérivé de facteur X souhaité (40  $\mu$ g dans un volume de 220  $\mu$ l ajusté avec de l'eau distillée) à 250  $\mu$ l d'une solution à un pH d'exactement 7,05 qui se compose de 50 mM HEPES, 1,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 280 mM NaCl, 10 mM KCl, et 12 mM Dextrose. La co-précipitation de l'ADN est obtenue par l'ajout de 31  $\mu$ l de CaCl<sub>2</sub> 2,5 M, au goutte à 30 goutte et sous agitation constante. Après 30 minutes d'incubation à température ambiante, le précipité est ajouté au milieu baignant les cellules et laissé à sédimentier pendant 3 heures à 37°C. Les cellules sont lavées par du PBS (afin de retirer la majeure partie du précipité), et remises en culture dans du milieu DMEM complet pendant 24 heures à 37°C.

Les cellules sont détachées de la boîte de Pétri par 2 ml d'une solution d'EDTA à 54 mM pH 8,0 contenant 0,5 mg/ml de trypsine, sont resuspendues dans le milieu de sélection (DMEM complet contenant 50 mg/L de méthotrexate (TEVA, Courbevoie, France), et sont réensemencées dans deux nouvelles boîtes de Pétri. Le milieu de culture est renouvelé tous les deux jours pendant 2 à trois semaines, jusqu'à l'obtention de colonies. Ces colonies sont isolées et transférées dans les puits (2 cm<sup>2</sup>) d'une plaque de culture à 10 24 puits où elles sont multipliées jusqu'à confluence dans le milieu de sélection.

Identification des clones producteurs d'un dérivé du facteur X :

La détection des clones exprimant de façon stable un dérivé de facteur X est faite par immuno-empreinte.

Un aliquote (30 µl) de surnageant de culture des cellules BHK-21, resté au contact des cellules transfectées pendant au moins 48 heures est ajouté à 10 µl de Tris-HCl 100 mM pH 6,8, contenant 40% (v/v) de glycérol, 8% (p/v) de SDS, 0,04% (p/v) de bleu de bromophénol et 20% (v/v) de β-mercaptopéthanol. Les protéines de l'échantillon sont dénaturées à 95°C pendant 5 minutes, et sont séparées sur gel de polyacrylamide à 12% (réticulation 29/1) en tampon Tris 25 mM pH 7,5 contenant 0,1 M glycine et 0,1% (p/v) SDS.

L'électrophorèse est suivie d'un transfert sur membrane de nitrocellulose (TRANS-BLOT, BIO-RAD, Ivry sur Seine, France) en tampon Tris-HCl 25 mM, glycine 0,1 M, pH 7,5 contenant 20% de méthanol. La membrane est saturée par une incubation pendant 1 heure à température ambiante dans une solution de lait écrémé à 5% (p/v) en tampon Tris 50 mM pH 7,5 contenant 150 mM de NaCl, 0,1% de Tween 20 (TTBS), puis lavée 3 fois pendant 10 minutes dans le même tampon. La membrane est ensuite incubée pendant 1 à 12 heures en présence de 50 ng/ml de l'anticorps monoclonal 9E10 en TTBS. Après trois lavages (comme précédemment) la membrane est incubée pendant une heure à température ambiante en présence d'un anticorps polyclonal de chèvre anti-IgG de souris, marqué à la phosphatase alcaline (BIO-RAD) dilué au 1/3000<sup>ème</sup>

dans du TTBS. La présence de la protéine recombinante est révélée par incubation de la membrane en présence d'un substrat chromogénique (mélange en quantités égales de 5-bromo, 4-chloro, 3-indolyl phosphate de toluidine (BCIPT) et 5 Chlorure de nitro tetrazolium (NTC), dilués en tampon Tris 0,1 M pH 9,5 contenant 0,5 M de MgCl<sub>2</sub>).

Culture cellulaire et production :

Les clones exprimant le plus fortement le dérivé de facteur X souhaité sont amplifiés, et conservés par 10 congélation dans l'azote liquide (environ 10<sup>6</sup> cellules dans 1 ml de sérum de veau fœtal additionné de 10% (v/v) DMSO).

La production des dérivés de facteur X est faite en milieu de sélection contenant 50 µM de zinc (pour 15 l'induction du promoteur de la métallothionine) et, pour les clones exprimant le dérivé FX-recombinant possédant un domaine Gla, 5 mg/ml de vitamine K<sub>1</sub> (ROCHE, Neuilly sur Seine, France) pour permettre la γ-carboxylation post-traductionnelle. Les cellules sont multipliées par passages 20 successifs en flacons de 150 cm<sup>2</sup> qui sont utilisés pour inoculer des bouteilles de 850 cm<sup>2</sup>. Les surnageants de culture sont récoltés tous les 2 à 6 jours (selon la densité des cellules), clarifiés par une centrifugation de 10 minutes à 5000 g, et conservés à -20°C après addition de 5 mM EDTA et 10 mM de benzamidine.

25 **EXEMPLE 3 : PURIFICATION DES DERIVES DU FACTEUR X**

La purification des dérivés a été faite en deux ou trois étapes selon le dérivé concerné.

La première étape est commune à toutes les purifications : il s'agit d'une adsorption sur résine 30 échangeuse d'anions afin de concentrer les protéines contenues dans le surnageant de culture.

Les surnageants de culture sont dilués au 1/3 dans du Tris 50 mM pH 7,5 contenant 10 mM de benzamidine et 5 mM d'EDTA. Typiquement, deux litres de surnageant sont 35 dilués dans quatre litres de tampon, 4,5 grammes de QAE SEPHADEX A50 (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH) sont ajoutés, et le mélange est agité lentement pendant 30 minutes à température

ambiante (à l'aide d'un agitateur rotatif à pales). Les billes de SEPHADEX sont laissées à sédimentier pendant une heure et le surnageant est écarté.

5 La résine chargée est transférée dans une colonne, et les protéines adsorbées sont éluées par du tampon Tris 50 mM pH 7,5 contenant 0,5 M NaCl.

La seconde étape est une chromatographie d'affinité permettant de séparer le dérivé de facteur X des autres protéines contenues dans l'éluat de QAE-SEPHADEX.

10 Le dérivé FX-recombinant est purifié par chromatographie d'affinité sur un gel AFFI-PREP HZ (BIO-RAD) greffé avec 3 mg par ml de gel de l'anticorps monoclonal 9E10. Après chargement de la colonne par l'éluat de QAE-SEPHADEX, et lavage en tampon Tris 50 mM pH 7,5 contenant 15 0,5 M de NaCl, le dérivé FX-recombinant est élué en tampon 0,1 M Glycine-HCl pH 2,7. Le pH de l'éluat est ajusté à 7,5 par ajout de 30 µl/ml de Tris 2 M, et la colonne est rééquilibrée dans le tampon de lavage.

20 La colonne d'affinité greffée avec l'anticorps 9E10 présente l'inconvénient d'avoir une faible capacité et de nécessiter une élution en milieu dénaturant. Une troisième étape de purification, par chromatographie d'échange d'anions à haute résolution, est nécessaire dans ce cas afin 25 d'éliminer le dénaturant et de concentrer le dérivé élué de la colonne.

Plusieurs éluats de la colonne d'affinité, totalisant 2 à 10 mg de dérivé FX-recombinant sont réunis, dilués au 1/4 en tampon Tris 50 mM pH 7,5 contenant 5 mM EDTA, et sont chargés sur une colonne (0,8 x 10 cm) de Q-30 SEPHAROSE FAST FLOW (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH). Après lavage en tampon de dilution, la colonne est éluée en tampon Tris 50 mM pH 7,5 contenant 0,5 M NaCl.

35 Les dérivés du facteur X dépourvus de domaine Gla, qui portent à leur extrémité N-terminale l'épitope reconnu par l'anticorps HPC-4, ont été purifiés sur une colonne d'affinité greffée avec cet anticorps. L'anticorps HPC-4 étant calcium-dépendant, la colonne peut être éluée par lavage en présence d'un chélateur de calcium, ce qui ne

dénature pas la protéine : le dérivé du facteur X ainsi purifié est directement utilisable.

5 Dans ce cas, l'eluat de QAE-SEPHADEX est préalablement recalcifié à 5 mM par l'addition de  $\text{CaCl}_2$ . La colonne est lavée en tampon Tris 50 mM pH 7,5 contenant 0,5 M de  $\text{NaCl}$  et 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , et le dérivé du facteur X est élué en tampon Tris 50 mM pH 7,5 contenant 100 mM  $\text{NaCl}$  et 5 mM EDTA.

Au total, un minimum de 10 mg de chacun des dérivés du facteur X ont été préparés.

10 Quel que soit le protocole utilisé, la pureté de la préparation est contrôlée, après dénaturation et réduction d'un échantillon, par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (12%, réticulation 29/1) et coloration au bleu de Coomassie.

15 Toutes les préparations obtenues apparaissent pures en gel de polyacrylamide-SDS, mais deux formes sont systématiquement présentes : une forme bicaténaire majoritaire (80 à 90%), avec des masses moléculaires apparentes compatibles avec celles attendues pour les chaînes 20 lourde et légère (50 et 23 kDa pour le FX-recombinant ; 50 et 18 kDa pour les dérivés dépourvus de domaine Gla) ; une forme monocaténaire minoritaire (10 à 20% selon les préparations), avec une masse moléculaire de 66 kDa pour le FX-recombinant et 60 kDa pour les dérivés dépourvu de 25 domaine Gla).

30 Le pourcentage de forme monocaténaire semble plutôt dépendre du pool de surnageants dont est issue la préparation que de la mutation introduite : pour une mutation donnée, le pourcentage de forme monocaténaire varie d'une purification à l'autre.

35 Les dérivés purifiés sont aliquotés, et conservés à  $-80^{\circ}\text{C}$  jusqu'à utilisation. La concentration de l'aliquote est estimée par son absorbance à 280 nm, en prenant  $1,25 \text{ g}^{-1} \text{ l} \text{ cm}^{-1}$  pour coefficient d'absorption molaire ( $\epsilon_{280}$ ).

EXEMPLE 4 : ACTIVATION PAR LA THROMBINE DES DERIVES DU FACTEUR X

Le facteur X natif n'est activable que par ses activateurs physiologiques (complexes tenase ou du facteur 5 tissulaire) et par certains venins de serpent, dont le plus utilisé est extrait de la vipère de Russell (RVV-X). Le domaine Gla du facteur X joue un rôle très important lors de cette activation : la vitesse d'activation du facteur X normal dépourvu de domaine Gla est en moyenne une centaine de 10 fois plus lente que celle du facteur X complet.

Le FX-recombinant se comporte essentiellement comme le facteur X plasmatique, sauf qu'une portion (qui est mal  $\gamma$ -carboxylée par les cellules BHK-21) est difficilement activable et n'est que peu active au sein du complexe 15 prothrombinase. Les dérivés du facteur X dépourvu de domaine Gla demeurent clivables (lentement) par l'activateur isolé du venin de serpent et (dans une certaine mesure) par les complexes physiologiques.

La capacité des dérivés dépourvus de domaine Gla 20 à être clivés par la thrombine a été testée.

Deux méthodes ont été utilisées pour évaluer la vitesse de clivage des dérivés du facteur X par la thrombine, selon que ce clivage génère ou non une activité amidolytique 25 détectable. Dans le premier cas, on mesure l'activité amidolytique générée par le facteur activé, dans le second, on quantifie par électrophorèse la forme clivée.

Mesure de l'activité amidolytique :

Les constantes de vitesse d'activation des dérivés du facteur X par la thrombine sont déterminées en 30 conditions de pseudo-premier ordre, c'est à dire que la concentration du zymogène est au plus égale à 0,1 fois la concentration de demi saturation de l'activateur (sa  $K_m$ ). Dans ces conditions, la constante de vitesse mesurée est directement proportionnelle à la constante de spécificité 35 ( $k_{cat}/K_m$ ) de l'activateur (la thrombine) pour son substrat (le zymogène dérivé du facteur X). Sans connaître la valeur de la  $K_m$ , on peut vérifier que la condition de pseudo-premier ordre est respectée en mesurant la vitesse d'activation à deux

concentrations de substrat : la constante de vitesse mesurée doit être la même (à l'erreur expérimentale près) pour les deux concentrations de zymogène.

Chaque dérivé de facteur X (1 et 10  $\mu$ M) est 5 incubé en présence de thrombine (100 nM) en tampon cinétique (Tris 50 mM pH 7,8, contenant 150 mM NaCl, 0,2% PEG 8000 (p/v), et 5 mM CaCl<sub>2</sub>), à 37°C. Après des temps d'incubation variables, un aliquote de 10  $\mu$ l est prélevé, auquel 1  $\mu$ M (100 unités par ml) d'hirudine (REFLUDAN, 10 HOECHST, Francfort, Allemagne) sont ajoutés (afin de stopper la réaction en neutralisant la thrombine). La quantité de forme active générée est estimée par l'activité amidolytique du dérivé activé. Après avoir ajouté 100  $\mu$ M de N- $\alpha$ -Z-Arg-Gly-Arg-pNA (S2765, BIOGENIC, Maurin, France), l'activité 15 amidolytique est mesurée en enregistrant la variation de l'absorbance à 405 nm en fonction du temps (la vitesse initiale d'hydrolyse du S2765) à l'aide d'un lecteur de microplaque MR5000 (DYNEX, Guyancourt, France). Avant 20 l'addition de thrombine, la vitesse d'hydrolyse du S2765 est nulle puisque le dérivé de facteur X est entièrement sous forme de zymogène. En traçant la vitesse initiale d'hydrolyse du S2765 en fonction du temps d'incubation du zymogène avec la thrombine, on obtient une courbe qui permet, par régression non-linéaire, d'estimer la constante de vitesse 25 d'activation du zymogène (k), à l'aide de l'équation 1 représentant une croissance exponentielle de premier ordre :

$$V_t = V_0 + V_{\max} (1 - \exp^{-kt}) \quad (\text{Equation 1})$$

30 dans laquelle  $V_t$  représente la vitesse d'hydrolyse du substrat chromogénique au temps t,  $V_0$  la vitesse d'hydrolyse du substrat chromogénique au temps zéro (normalement nulle),  $V_{\max}$  la vitesse d'hydrolyse du substrat chromogénique à temps infini (lorsque tout le zymogène est activé). Si la condition de pseudo-premier ordre est 35 respectée, la valeur de k est égale à la concentration de l'activateur (la thrombine) multipliée par la  $k_{\text{cat}}/K_m$  de la réaction d'activation du zymogène. Cette méthode permet donc de comparer la capacité de la thrombine à activer les dérivés

du facteur X qui génèrent une activité amidolytique après activation. A la seule condition qu'une activité catalytique soit mesurable, cette méthode est applicable quelque soit l'activité amidolytique générée : elle revient en fait à mesurer le pourcentage d'activation en fonction du temps.

5 Quantification par électrophorèse.

Alternativement, si aucune activité catalytique n'est détectable, la capacité de la thrombine à cliver le dérivé du facteur X est détectée en gel de polyacrylamide-10 SDS. L'incubation du zymogène substrat avec son activateur est faite dans les mêmes conditions de pseudo-premier ordre que ci-dessus. Après des temps d'incubation variables, un aliquote de 20  $\mu$ l est prélevé, et analysé par une électrophorèse sur gel de polyacrylamide (12%, réticulation 15 29/1) après dénaturation et réduction de l'échantillon.

Après coloration au bleu de Coomassie, le gel est scanné, et l'intensité de chaque bande de migration est estimée avec un logiciel d'analyse d'image (SCION-IMAGE, disponible à l'adresse <http://www.scioncorp.com>).

20 Cette méthode permet d'évaluer pour chaque prélèvement le pourcentage de chaque forme du dérivé de facteur X (monocaténaire inactif, bicaténaire inactif, activé sous forme  $\alpha$ , activé sous forme  $\beta$ ). En traçant l'intensité des bandes correspondant aux formes activées en fonction du temps d'incubation du zymogène avec la thrombine, on obtient 25 une courbe qui permet, par régression non-linéaire, d'estimer la constante de vitesse d'activation du zymogène ( $k$ ), à l'aide de l'équation 1 dans laquelle  $V_t$ ,  $V_0$  et  $V_{max}$  sont respectivement remplacées par : l'intensité de la bande au 30 temps  $t$ , au temps zéro (normalement nulle) et à temps infini (lorsque 100% du zymogène est activé). Si la condition de pseudo-premier ordre est respectée, la valeur de  $k$  est égale à la concentration de l'activateur (la thrombine) multipliée par la  $k_{cat}/K_m$  de la réaction d'activation du zymogène. Dans 35 la pratique, il est plus fiable d'évaluer la disparition du zymogène au cours du temps. En traçant l'intensité des bandes correspondant aux formes zymogènes en fonction du temps d'incubation avec la thrombine on obtient une courbe qui

permet, par régression non-linéaire, à l'aide de l'équation 2 ci-après (représentant une décroissance exponentielle de premier ordre), d'estimer la constante de vitesse d'activation du zymogène :

5  $d_t = d_0 + d_{\min} \exp^{(-kt)}$  (Equation 2)

Dans cette équation,  $d_t$  représente la densité au temps  $t$ ,  $d_0$  la densité au temps zéro (qui est maximale),  $d_{\min}$  la densité au temps infini (qui est nulle lorsque tout le zymogène est activé). Si la condition de pseudo-premier ordre 10 est respectée, la valeur de  $k$  est égale à la concentration de l'activateur (la thrombine) multiplié par la  $k_{\text{cat}}/K_m$  de la réaction d'activation du zymogène. Cette méthode est applicable quel que soit le dérivé du facteur X considéré, mais elle est moins précise que la méthode chromogénique.

15 Les résultats sont illustrés par le tableau V.

La valeur de la  $k_{\text{cat}}/K_m$  pour l'activation de chaque dérivé du facteur X par la thrombine est donnée, ainsi que l'erreur standard (exprimée en pourcentage de la valeur obtenue).

20

Dérivé	$k_{\text{cat}}/K_m (M^{-1} s^{-1})$
GD-FX	ND
GDX-IVG	<1
GDX-IFG	<1
GDX-AVG	$1 \ 10^2 (\pm 9\%)$
GDX-IFR	ND
GDX-SVG	<1
GDX-SFR	$4 \ 10^3 (\pm 27\%)$

Comme son homologue plasmatique normal, le FX-recombinant n'est pas clivable par la thrombine de façon détectable (ND), de même que le dérivé GD-FX. Au contraire, le dérivé GDX-SFR est clivé très rapidement par la thrombine : la valeur de la  $k_{\text{cat}}/K_m$  est de  $4 \ 10^3 M^{-1} s^{-1}$ , toutefois, le dérivé clivé est dépourvu d'activité amidolytique. Le dérivé GDX-SVG est également clivé par la thrombine, mais ne génère pas non plus d'activité amidolytique détectable. La valeur de la  $k_{\text{cat}}/K_m$  pour le clivage par la thrombine du dérivé GDX-AVG est de  $10^2 M^{-1} s^{-1}$ , et le dérivé activé possède une activité amidolytique aisément détectable. Les autres dérivés du facteur X (GDX-IVG, GDX-IFG, et GDX-IFR) semblent clivables par la

thrombine, mais la réaction est trop lente pour que la valeur de la  $k_{cat}/K_m$  puisse être estimée de façon fiable.

**EXEMPLE 5 : PREPARATION ET CARACTERISATION DE LA FORME ACTIVEE DES DERIVES DU FACTEUR X**

5 Pour mieux caractériser l'activité catalytique (après clivage) de chacun des dérivés du facteur X, plusieurs milligrammes de chaque dérivé ont été activés et purifiés.

10 Les dérivés du facteur X portant en position  $P_3$ ,  $P_2$  et  $P_1$  de leur site d'activation la séquence LTR (FX-recombinant et dérivé GD-FX) ne sont pas clivables par la thrombine. Ils ont été activés par passage sur une colonne (5 ml) HITRAP NHS-activée (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH) greffée à 5 mg/ml de gel avec de l'activateur isolé du venin de la vipère de Russell (RVV-X) (KORDIA, Leiden, Pays-Bas).

15 Quatre milligrammes de dérivé du facteur X en tampon Tris 50 mM pH 7,5 contenant 150 mM NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, et 0,2% (p/v) PEG 8000, sont introduits dans la colonne greffée par le RVV-X. La colonne est fermée aux deux extrémités, et l'incubation est prolongée pendant 16 heures à température ambiante. Le 20 dérivé activé est élué par du Tris 50 mM pH 7,5 contenant 0,5 M NaCl et 5 mM CaCl<sub>2</sub>. L'éluat contient principalement la forme activée mais l'activation n'est pas toujours complète. Pour enrichir l'éluat en forme activée, il est dilué au 1/3 en Tris 50 mM pH 7,5 contenant 5 mM de CaCl<sub>2</sub> (pour 25 réduire la force ionique), chargé sur une colonne HITRAP héparine-SEPHAROSE de 1 ml (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH), et élué par du tampon Tris 50 mM pH 7,5 contenant 0,5 M NaCl et 5 mM de CaCl<sub>2</sub>.

30 Les autres dérivés du facteur X, qui sont activables (même lentement) par la thrombine ont tous été activés par passage sur une colonne (1 ml) HITRAP NHS-activée (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH) greffée par 1 mg/ml de gel avec de la thrombine. Les conditions d'incubation (concentration, tampon, température et durée) sont les mêmes que pour 35 l'activation par passage au travers de la colonne greffée par du RVV-X; l'élution de la colonne et la purification de la forme activée du dérivé sur héparine-SEPHAROSE également.

La séquence N-terminale de la chaîne lourde produite par activation des différents dérivés du facteur X a été déterminée par microséquençage. Chaque séquence obtenue correspond sans ambiguïté à l'extrémité N-terminale attendue pour la chaîne lourde de la forme activée du dérivé considéré (IVG, IFG, IFR, AVG, SVG ou SFR) après clivage entre les résidus  $P_1$  et  $P_1'$  du site d'activation.

Interaction avec les peptides chlorométhyl-cétone :

Les peptides chlorométhyl-cétone sont des inhibiteurs irréversibles des sérine-protéases, qui forment un complexe équimoléculaire et covalent avec leur cible. La vitesse de l'interaction d'un peptide chlorométhyl-cétone avec une protéase dépend de la séquence qui précède le groupe chlorométhyl-cétone. Ces inhibiteurs permettent en fait d'évaluer l'intégrité du site actif de la cible : la constante de vitesse de la réaction (la  $k_{on}$ ) est en effet une signature qui est spécifique à chaque couple inhibiteur/protéase. L'un des peptides chlorométhyl-cétone les plus réactifs avec la forme activée du facteur X est le D-Phe-Phe-Arg-CH<sub>3</sub>Cl (D-FFR-CK, commercialisé par CALBIOCHEM, Meudon, France). Lorsque la réaction est faite en conditions de pseudo-premier ordre, la  $k_{on}$  peut être estimée même si l'on ne connaît pas précisément la concentration de la cible. Connaissant la  $k_{on}$ , il est possible de prédire les conditions expérimentales qui permettront de titrer avec précision la concentration en site actif de la protéase (voir ci-dessous). Cette titration est un préalable pour une véritable caractérisation fonctionnelle.

Dans un volume réactionnel de 10  $\mu$ l, une quantité suffisante de la forme activée du dérivé du facteur X pour obtenir une activité amidolytique aisément détectable est incubée pendant un temps donné en présence d'une concentration fixe de D-FFR-CK en tampon cinétique à 25°C. La concentration des réactifs est en fait très variable : 30 nM à 1,8  $\mu$ M de forme activée (d'après l'absorbance à 280 nm) selon le dérivé du facteur X pour avoir une activité amidolytique aisément détectable (10% d'hydrolyse du substrat chromogénique en 30 minutes). La concentration de D-FFR-CK

ajoutée doit être largement supérieure à celle de sa cible, de façon à ce que la réaction se produise en conditions de pseudo-premier ordre. La concentration de D-FFR-CK ne doit toutefois pas être trop forte, sinon la réaction est trop  
5 rapide. Typiquement, trois concentrations de D-FFR-CK sont essayées, qui correspondent à 10, 20, et 40 fois celle de la cible (estimée par son absorbance à 280 nm). La même expérience est recommandée une douzaine de fois, en variant le temps d'incubation d'une expérience à l'autre (de  
10 10 secondes pour la première à 5 heures pour la dernière, de telle sorte que le temps d'incubation pour une expérience donnée soit égal au double de celui de la précédente). A l'issue de chaque incubation, 190  $\mu$ l de S2765 100  $\mu$ M en tampon cinétique sont ajoutés, et l'activité amidolytique  
15 résiduelle est mesurée en enregistrant la variation de l'absorbance à 405 nm en fonction du temps (c'est-à-dire la vitesse initiale d'hydrolyse du S2765) à l'aide d'un lecteur de microplaques MR5000. En traçant la vitesse d'hydrolyse du S2765 en fonction du temps d'incubation de l'inhibiteur avec  
20 sa cible, on obtient une courbe qui permet, par régression non-linéaire, à l'aide de l'équation 2, d'estimer la constante de vitesse d'inactivation de la forme activée du dérivé du facteur X. Les paramètres  $d_t$ ,  $d_0$  et  $d_{\min}$  de l'équation 2 représentent dans ce cas l'activité résiduelle  
25 au temps  $t$ , l'activité initiale (qui est maximale), et l'activité à temps infini (qui est normalement nulle). Si la condition de pseudo-premier ordre est respectée, la valeur obtenue pour  $k$  est égale à la concentration de l'inhibiteur multipliée par sa  $k_{on}$  pour l'enzyme.

30 Les valeurs de la  $k_{on}$  du D-FFR-CK pour les formes activées des dérivés du facteur X obtenues sont résumées dans le tableau VI, ainsi que l'erreur standard (exprimée en pourcentage de la valeur obtenue). La  $k_{on}$  pour les dérivés dépourvus d'activité catalytique ne peut pas être déterminée  
35 par la méthode utilisée (ND).

TABLEAU VI

Dérivé	$k_{on}$ (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )
FX plasmatische	2304 ( $\pm 1\%$ )
GD-FX	2233 ( $\pm 3\%$ )
GDX-IVG	2250 ( $\pm 4\%$ )
GDX-IFG	104 ( $\pm 4\%$ )
GDX-AVG	2 ( $\pm 10\%$ )
GDX-IFR	ND
GDX-SVG	ND
GDX-SFR	ND

La valeur de la  $k_{on}$  de la forme activée du dérivé du FX-recombinant, de la forme activée du dérivé GD-FX, et de la forme activée du dérivé GDX-IVG sont toutes similaires à celle obtenue avec la forme activée du facteur X d'origine plasmatische. Ce résultat était attendu : les zymogènes de ces dérivés du facteur X diffèrent par la présence ou non d'un domaine Gla ainsi que par les résidus P<sub>3</sub> et P<sub>2</sub> en amont du site d'activation, mais le domaine catalytique du produit de leur activation est identique.

La valeur de la  $k_{on}$  pour la forme activée du dérivé GDX-IFG est 20 fois plus faible : ceci suggère que le sillon catalytique de ce dérivé du facteur X n'est pas strictement préservé par la mutation. La valeur de la  $k_{on}$  pour la forme activée du dérivé GDX-AVG est 1000 fois inférieure. Les dérivés du facteur X qui, après clivage, sont dépourvus d'activité amidolytique détectables (GDX-IFR, GDX-SVG et GDX-SFR) ne peuvent pas être analysés par cette méthode.

20 Titration de la forme activée des dérivés du facteur X :

La concentration en site actif de la forme activée des dérivés du facteur X est une grandeur qu'il est indispensable de déterminer pour pouvoir évaluer l'activité catalytique effective de chaque mutant. L'absorbance à 280 nm permet bien de calculer la concentration de la protéase purifiée, mais elle ne fournit aucune indication sur la proportion en forme active de l'échantillon. Au contraire, la titration permet d'estimer la concentration en forme active, quelque soit le pourcentage de forme zymogène résiduelle ou l'activité intrinsèque du mutant par rapport à la protéase normale.

Une méthode très précise pour titrer les sérine-protéases repose sur l'utilisation d'un peptide chlorométhyl-cétone, à la condition que l'enzyme possède une activité catalytique mesurable et que la demi-vie de la réaction du titrant avec sa cible puisse être prédite. Trois des formes activées de dérivés du facteur X répondent à ces critères, et ont été titrées par cette méthode : en mesurant l'activité amidolytique résiduelle après incubation avec des concentrations croissantes d'inhibiteur. Le peptide chlorométhyl-cétone utilisé est le D-FFR-CK dont la valeur de la  $k_{cr}$  pour chaque cible a été déterminée ci-dessus.

Des concentrations croissantes de D-FFR-CK, comprises entre 20 nM et 12  $\mu$ M, sont incubées avec une quantité fixe (0,5 à 1  $\mu$ M) de la forme active du dérivé du facteur X à titrer, en tampon cinétique à 25°C. L'incubation est prolongée jusqu'à ce que la réaction soit complète : c'est-à-dire qu'un minimum de 10 demi-vies soient couvertes (la demi-vie de la réaction est égale au logarithme népérien de 2 divisé par le produit de la  $k_{on}$  avec la concentration de l'inhibiteur). A l'issue de cette incubation, 190  $\mu$ l de S2765 100  $\mu$ M en tampon cinétique sont ajoutés, et l'activité amidolytique résiduelle est mesurée en enregistrant la variation de l'absorbance à 405 nm en fonction du temps (c'est-à-dire la vitesse initiale d'hydrolyse du S2765) à l'aide d'un lecteur de microplaques MR5000. En traçant la vitesse d'hydrolyse du S2765 en fonction de la concentration en D-FFR-CK, on obtient une droite dont l'abscisse à l'origine correspond à la concentration initiale en enzyme active (LE BONNIEC et al., *Biochemistry.*, 33, 3959-3966, 1994).

La forme activée du dérivé GDX-AVG n'a pas pu être titrée par cette méthode, parce que la valeur de la  $k_{on}$  du D-FFR-CK ( $2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) est trop faible pour permettre d'achever la réaction dans un temps raisonnable : en présence d'un  $\mu$ M de D-FFR-CK, il faudrait prolonger la réaction 15 jours pour couvrir une dizaine de demi-vies alors que la stabilité du D-FFR-CK ne dépasse pas 48 heures à pH 7,5. Les formes "activées" des dérivés du facteur X qui sont dépourvus

d'activité amidolytique détectable (GDX-IFR, GDX-SVG et GDX-SFR) n'ont pas non plus été titrés à l'aide de D-FFR-CK. Pour ces dérivés, le pourcentage de forme active a simplement été estimé par densitométrie après électrophorèse en gel de 5 polyacrylamide (12%, réticulation 29/1), après dénaturation et réduction de l'échantillon (comme décrit ci-dessus pour l'identification des clones de BHK-21 producteurs d'un dérivé du facteur X). Après coloration au bleu de Coomassie, le gel est scanné, et l'intensité des bandes correspondant aux 10 chaînes lourdes  $\alpha$  et  $\beta$  activées est comparée à celles des formes non clivées résiduelles à l'aide du logiciel d'analyse SCION-IMAGE. Cette méthode permet d'évaluer le pourcentage de forme activée de chaque aliquote de dérivé de facteur X. En 15 comparant ce pourcentage en forme activées avec la concentration totale estimée par l'absorbance à 280 nm, on en déduit la concentration effective en formes  $\alpha$  et  $\beta$  activées.

Cette méthode est plus lourde que la précédente, mais suffisamment fiable pour pouvoir faire une caractérisation fonctionnelle des mutants concernés.

#### 20 Activité amidolytique :

L'activité amidolytique des sérine-protéases ne fait intervenir que leur sillon catalytique et leur système de relais de charges. Elle est mesurée à l'aide de substrats synthétiques composés d'un petit peptide portant en C-terminal un groupe *para*-nitroanilide; lors de l'hydrolyse de 25 ces substrats, du *para*-nitroaniline (pNA), facilement détectable à 405 nm, est libéré. Ces peptides permettent une caractérisation très fine de la machinerie catalytique d'une protéase : la  $k_{cat}$  et la  $K_m$  pour l'hydrolyse de l'un de ces 30 substrats constituent ici encore une signature qui est unique pour chaque couple enzyme/substrat. La mesure de l'activité amidolytique des formes activées des dérivés du facteur X permettait donc de détecter si leur machinerie catalytique était altérée ou non. Deux substrats chromogéniques ont été 35 utilisés pour cette analyse : le S2765, et le Benzyl-CO-Ile-Glu-( $\gamma$ -OR)-Gly-Arg-pNA (S2222) commercialisé par BIOGENIC.

La détermination des valeurs de la  $k_{cat}$  et de la  $K_m$  des formes activées des dérivés du facteur X est faite en

5 tampon cinétique, à 25°C. Des concentrations variables de substrat (comprises entre 6 et 800  $\mu$ M) sont incubées avec une quantité fixe de la forme activée du dérivé du facteur Xa (10 nM à 0,5  $\mu$ M selon la forme activée du dérivé du facteur X, de telle sorte qu'au moins 10% du substrat chromogénique soit hydrolysé en 30 minutes). La variation de l'absorbance à 405 nm en fonction du temps est enregistrée à l'aide d'un lecteur de microplaques MR5000, et la vitesse initiale d'hydrolyse estimée par régression linéaire (seules 10 les absorbances correspondant au plus à 15% d'hydrolyse du substrat sont prises en compte pour l'analyse). La valeur de la  $k_{cat}$  et de la  $K_m$  sont estimées par régression non-linéaire de la variation de la vitesse initiale d'hydrolyse en fonction de la concentration initiale en substrat à l'aide de 15 l'équation de Michaelis-Menten.

20 Les valeurs de la  $k_{cat}$  et de la  $K_m$  et du rapport  $k_{cat}/K_m$  du S2222 et du S2765, ainsi que l'erreur standard (exprimée en pourcentage de la valeur obtenue), pour les formes activées des dérivés du facteur X sont indiquées dans le tableau VII.

Ces constantes ne peuvent pas être estimées pour les dérivés dépourvus d'activité amidolytique détectable (ND).

TABLEAU VII

Benzyl-CO-Ile-Glu-( $\gamma$ -OR)-Gly-Arg-pNA (S2222)			
Dérivé	$K_m$ ( $\mu$ M)	$k_{cat}$ ( $s^{-1}$ )	$k_{cat}/K_m$ ( $M^{-1} s^{-1}$ )
FX plasmatique	260 ( $\pm 15\%$ )	79 ( $\pm 6\%$ )	$3 \cdot 10^5$
FX recombinant	210 ( $\pm 5\%$ )	59 ( $\pm 2\%$ )	$3 \cdot 10^5$
GD-FX	480 ( $\pm 5\%$ )	68 ( $\pm 2\%$ )	$1 \cdot 10^5$
GDX-IVG	410 ( $\pm 6\%$ )	107 ( $\pm 3\%$ )	$3 \cdot 10^5$
GDX-IFG	1500 ( $\pm 8\%$ )	8 ( $\pm 5\%$ )	$5 \cdot 10^3$
GDX-AVG	1300 ( $\pm 28\%$ )	1 ( $\pm 17\%$ )	$5 \cdot 10^2$
GDX-IFR	ND	ND	ND
GDX-SVG	ND	ND	ND
GDX-SFR	ND	ND	ND
N- $\alpha$ -Z-Arg-Gly-Arg-pNA (S2765)			
Dérivé	$K_m$ ( $\mu$ M)	$k_{cat}$ ( $s^{-1}$ )	$k_{cat}/K_m$ ( $M^{-1} s^{-1}$ )
FX plasmatique	90 ( $\pm 24\%$ )	182 ( $\pm 7\%$ )	$2 \cdot 10^6$
FX recombinant	65 ( $\pm 6\%$ )	126 ( $\pm 2\%$ )	$2 \cdot 10^6$
GD-FX	80 ( $\pm 14\%$ )	89 ( $\pm 4\%$ )	$1 \cdot 10^6$
GDX-IVG	75 ( $\pm 14\%$ )	153 ( $\pm 4\%$ )	$2 \cdot 10^6$
GDX-IFG	820 ( $\pm 6\%$ )	61 ( $\pm 3\%$ )	$7 \cdot 10^4$
GDX-AVG	3750 ( $\pm 21\%$ )	19 ( $\pm 18\%$ )	$5 \cdot 10^3$
GDX-IFR	ND	ND	ND
GDX-SVG	ND	ND	ND
GDX-SFR	ND	ND	ND

Les valeurs de la  $k_{cat}$  et de la  $K_m$  pour la forme activée du dérivé du FX-recombinant, celles de la forme activée du FX-recombinant dépourvu de domaine Gla, et celles du dérivé GDX-IVG sont similaires à celles obtenues pour la forme activée du facteur X d'origine plasmatique (elles diffèrent au plus d'un facteur deux). Hormis l'épitope en C-terminal, le domaine catalytique qui est formé lors de l'activation de ces dérivés du facteur X est identique, aussi, comme pour la  $k_{on}$  du D-FFR-CK, il était attendu que leurs activités amidolytiques soient au minimum comparables. Il est intéressant de noter que l'absence du domaine Gla n'a pas de conséquences notables sur l'activité amidolytique de la forme activée du dérivé : ceci suggère qu'il n'influe pas sur la structure du sillon catalytique de la forme activée du facteur X. En comparaison, la valeur de la  $k_{cat}$  de la forme activée du dérivé GDX-IFG est diminuée (de 10 fois pour le S2222 et de 3 fois pour le S2765); de même la valeur de la  $K_m$  est augmentée (de 5 à 10 fois). Au total la  $k_{cat}/K_m$  pour ces substrats chromogéniques est de 30 à 50 fois plus petite que pour la forme activée du facteur X normal, une diminution qui est donc du même ordre de grandeur que celle observée pour la

$k_{on}$  du D-FRR-CK (2 fois). La diminution de la valeur de la  $k_{cat}$  de la forme activée du dérivé GDX-AVG est en proportion beaucoup plus marquée (une centaine de fois pour le S2222, une dizaine pour le S2765), de même l'augmentation de la  $K_m$  (5 fois plus élevée pour le S2222, 40 fois pour le S2765). Au total la  $k_{cat}/K_m$  pour ces substrats chromogéniques est de 400 à 600 fois plus petite que pour la forme activée du facteur X normal; ces valeurs concordent avec la diminution observée pour la  $k_{on}$  du D-FFR-CK (1000 fois). Ces résultats confirment que les mutations portées par les dérivés GDX-IFG et GDX-AVG induisent bien des modifications structurales dans le sillon catalytique et/ou perturbent l'activité du système de relais de charges.

Activité au sein du complexe prothrombinase :

Le facteur Xa natif n'est pas une enzyme très active comparée à la trypsine ou à la thrombine. Physiologiquement, ce n'est que lorsque l'enzyme se lie à son cofacteur (le facteur Va de la coagulation), en présence de phospholipides et de calcium, que la réaction d'activation de la prothrombine devient très rapide (la réaction est des milliers de fois plus rapide en présence des cofacteurs qu'en leur absence). L'activité au sein du complexe prothrombinase est toutefois fortement dépendante de la présence d'un domaine Gla : sans lui, la vitesse n'est augmentée, au plus, que de 50 fois. Cette différence est cependant largement suffisante pour permettre de détecter si la forme activée des dérivés du facteur X interagit ou non avec le facteur Va, et surtout si le cofacteur lui permet ou non d'activer efficacement la prothrombine. Les Inventeurs ont donc comparé la vitesse d'activation de la prothrombine par chacune des formes activées des dérivés du facteur X, en présence comme en absence de facteur Va, de phospholipides, et de calcium.

L'effet cofacteur du facteur Va (KORDIA) est étudié en système purifié strictement contrôlé : la prothrombine en particulier est immunopurifiée (LE BONNIEC et al. J. Biol. Chem., 266, 13796-803, 1991; LE BONNIEC et al., 1992, précité), afin d'être exempte de toute trace de forme activée (facteur X ou de thrombine). L'activation de cette

prothrombine est détectée par la formation de thrombine qui en résulte. La réaction est suivie en continu grâce à la présence dans le milieu réactionnel d'un substrat chromogénique, le H-D-Phe-Pip-Arg-pNA (S2238, BIOGENIC), qui est beaucoup plus sensible à la thrombine qu'à la forme activée du facteur X. Au temps zéro, il n'y a pas de thrombine et le S2238 n'est hydrolysé que de façon insignifiante par la forme activée du dérivé du facteur X. Durant la réaction, la concentration de thrombine augmente linéairement au cours du temps (lorsque la réaction d'activation de la prothrombine par la forme activée du dérivé du facteur X est en phase stationnaire). La vitesse d'hydrolyse du S2238 est directement proportionnelle à la concentration de thrombine, mais celle-ci augmente au cours du temps. La vitesse de clivage n'est donc pas constante, elle va de plus en plus vite : la réaction accélère. On peut montrer (KOSOW, Thromb. Res. Suppl., 4, 219-227, 1974) que la quantité de pNA relarguée par le S2238 hydrolysé (donc l'absorbance à 405 nm du mélange) est proportionnelle au coefficient d'accélération de la réaction multiplié par le carré du temps; le coefficient d'accélération étant lui directement proportionnel à la vitesse initiale de la formation de thrombine. En pratique, 195  $\mu$ l de tampon cinétique contenant 100  $\mu$ M de S2238, 0,5  $\mu$ M de prothrombine, 35  $\mu$ M de vésicules phospholipidiques (mélange de phosphatidylsérine et phosphatidylcholine dans une proportion de 20%-80% p/p), en présence ou non de 20 nM de facteur Va sont préincubés à 37°C dans une plaque de microtitration. La réaction est déclenchée par l'addition de 2,5 nM de la forme activée du dérivé du facteur X (5  $\mu$ l à 50 nM), et la variation de l'absorbance à 405 nm en fonction du temps est enregistrée à l'aide d'un lecteur de microplaques MR5000. En traçant l'absorbance à 405 nm en fonction du temps d'incubation, on obtient une courbe qui permet, par régression non-linéaire, d'estimer  $c$ , le coefficient d'accélération de la réaction, à l'aide de l'équation 3 :

$$A_{405} = A_0 + bt + ct^2 \quad (\text{Equation 3})$$

dans laquelle  $A_0$  représente l'absorbance initiale du mélange à 405 nm (avant addition de l'enzyme), et  $b$  la vitesse d'hydrolyse du S2238 par la forme activée du dérivé du facteur X (qui est négligeable dans la pratique). Si la réaction d'activation de la prothrombine par la forme activée du dérivé du facteur X est en phase stationnaire, et si la concentration résiduelle en S2238 non hydrolysé reste largement supérieure à sa  $K_m$  pour la thrombine (3,6  $\mu\text{M}$ ), le paramètre  $c$  est effectivement proportionnel à la vitesse initiale d'activation de la prothrombine par la forme activée du dérivé du facteur X. Afin de remplir ces conditions, seuls les points expérimentaux correspondants à moins de 15% d'hydrolyse de chaque substrat (prothrombine et S2238) sont pris en compte pour l'analyse par régression non-linéaire. Cette approche ne permet pas d'estimer les constantes catalytiques de l'activation de la prothrombine par la forme activée des dérivés du facteur X, elle permet seulement, lorsque la réaction est faite dans des conditions identiques, de comparer l'activité de deux enzymes (ici l'activité de chaque forme activée de dérivés du facteur X est comparée à celle de la forme activée dépourvu de domaine Gla qui sert de référence).

Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau VIII.

Les coefficients d'accélération de la libération de pNA par la thrombine générée par le complexe prothrombinase (+ facteur Va) ou par le dérivé activé du facteur X seul (- facteur Va) sont indiqués, ainsi que l'erreur standard (exprimée en pourcentage de la valeur obtenue).

TABLEAU VIII

Dérivé	+ facteur Va	- facteur Va
GD-FX	$4,2 \cdot 10^{-4}$ ( $\pm 2\%$ )	$8,8 \cdot 10^{-6}$ ( $\pm 2\%$ )
GDX-IVG	$1,1 \cdot 10^{-4}$ ( $\pm 13\%$ )	$2,8 \cdot 10^{-5}$ ( $\pm 2\%$ )
GDX-IFG	$4,9 \cdot 10^{-6}$ ( $\pm 1\%$ )	$1,0 \cdot 10^{-7}$ ( $\pm 2\%$ )
GDX-AVG	$3,1 \cdot 10^{-5}$ ( $\pm 1\%$ )	$9,6 \cdot 10^{-7}$ ( $\pm 2\%$ )
GDX-IFR	$3,3 \cdot 10^{-6}$ ( $\pm 1\%$ )	ND
GDX-SVG	ND	ND
GDX-SFR	ND	ND

En présence de phospholipides et de calcium (mais en l'absence de facteur Va) l'activation de la prothrombine

est très lente et difficilement détectable, y compris pour la forme activée du facteur X dépourvu de domaine Gla ou celle de son dérivé GDX-IVG; l'addition de facteur Va augmente la vitesse d'activation de la prothrombine de 50 et 10 fois, 5 respectivement. En l'absence de facteur Va, l'activation de la prothrombine n'est détectable pour aucune des autres formes activées de dérivés du facteur X (GDX-AVG, GDX-IFG, GDX-IFR, GDX-SVG et GDX-SFR). L'addition de facteur Va permet d'augmenter considérablement la vitesse d'activation de la 10 prothrombine par la forme activée du dérivé GDX-AVG : celle-ci n'est plus que 13 fois inférieure à celle que l'on obtient pour la forme activée de son homologue non muté (GDX-IVG). Il semble donc que le facteur Va restaure en grande partie 15 l'activité catalytique de la forme activée du dérivé GDX-AVG, puisque, comparée à son homologue non muté, les sondes du sillon catalytique (D-FFR-CK, S2765 et S2222) trahissaient une efficacité de catalyse diminuée d'au moins 400 fois. Avec les autres formes activées de dérivés du facteur X (GDX-IFG, GDX-IFR, GDX-SVG et GDX-SFR) l'addition de facteur Va est 20 loin d'avoir un effet aussi marqué : elle ne permet toujours pas de détecter une activation de la prothrombine (ND).

Inhibition par l'antithrombine :

Le plus puissant inhibiteur plasmatique de la forme activée du facteur X est l'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire (TFPI), la valeur de sa  $k_{on}$  pour l'interaction avec la forme activée du facteur X est supérieure à  $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Toutefois, la concentration plasmatique du TFPI (2,5 nM) fait que cet inhibiteur joue un rôle relativement mineur dans l'inhibition de la forme activée du facteur X (sa cible physiologique est plutôt le facteur VIIa de la coagulation). 25 30

L'antithrombine (seule) est un inhibiteur relativement moins puissant puisque la valeur de sa  $k_{on}$  pour l'interaction avec la forme activée du facteur X n'est que de l'ordre de  $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . La concentration plasmatique de l'antithrombine (2,3  $\mu\text{M}$ ) en fait cependant le principal inhibiteur physiologique du facteur Xa : à cette concentration, la demi-vie plasmatique de la forme activée du

facteur X ne serait que de 30 secondes (nous avons expérimentalement mesuré une minute, voir ci-dessous). Surtout, en présence d'héparine, la valeur de la  $k_{on}$  de l'antithrombine pour l'interaction avec la forme activée du facteur X dépasse  $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , c'est-à-dire que, pour une concentration plasmatique d'antithrombine de  $2,3 \mu\text{M}$ , la neutralisation de la protéase se produit en quelques secondes (la demi-vie ne serait plus que de 0,3 seconde). Il était donc essentiel de déterminer la  $k_{on}$  de l'interaction de l'antithrombine avec les formes activées des dérivés du facteur X, puisque toute augmentation de la demi-vie plasmatique prolongerait l'action procoagulante du dérivé du facteur X, donc potentialiserait son effet anti-hémophilique.

Les Inventeurs ont déterminé la capacité de chaque forme activée des dérivés du facteur X à former un complexe covalent stable avec l'antithrombine. Ils ont également estimé la valeur de la  $k_{on}$  de l'antithrombine (en présence et en absence d'héparine) pour les formes activées de dérivés du facteur X ayant une activité amidolytique détectable (dérivé dépourvu de domaine Gla, et dérivés GDX-IVG, GDX-IFG et GDX-AVG).

La mise en évidence de complexes covalents entre la forme activée des dérivés du facteur X ( $1 \mu\text{M}$ ) et l'antithrombine ( $2 \mu\text{M}$  ; purifiée à partir de plasma humain selon la technique décrite par MCKAY (Thromb. Res., 21, 375-382, 1981) est faite en présence de 2 unités/ml d'héparine (KORDIA). L'incubation est prolongée pendant une heure à  $25^\circ\text{C}$ , et le mélange réactionnel est analysé par une électrophorèse sur gel de polyacrylamide (10%, réticulation 29/1), après dénaturation et réduction de l'échantillon. Après coloration au bleu de Coomassie, la présence de complexes covalents entre la forme (inactivée) du dérivé du facteur X et l'antithrombine se traduit par la diminution de l'intensité de la bande correspondant à l'antithrombine (60 kDa), une diminution de l'intensité de la bande correspondant à la forme activée du dérivé du facteur X (31 kDa), et l'apparition d'une nouvelle bande d'un poids

moléculaire plus élevé (environ 100 kDa), correspondant au complexe covalent.

Les résultats sont illustrés par la Figure 3.

Pistes 1 et 8: antithrombine seule; pistes 2 et 5 3 : dérivé GDX-IVG sans et avec antithrombine ; pistes 4 et 5 5 : dérivé GDX-IFG sans et avec antithrombine ; pistes 6 et 7 7 : dérivé GDX-IFR sans et avec antithrombine ; pistes 9 et 10 10 : dérivé GDX-SVG sans et avec antithrombine ; pistes 11 et 12 12 : dérivé GDX-SFR sans et avec antithrombine ; pistes 13 et 10 14 14 : dérivé GDX-AVG sans et avec antithrombine.

La formation d'un complexe se traduit par l'apparition d'une bande de haut poids moléculaire (pistes 3, 5, 7, 10, et 14), qui est absente lorsque l'antithrombine (pistes 1 et 8), ou l'une des formes activées des analogues 15 du facteur X (pistes 2, 4, 6, 9, 11, 13) sont utilisées seules. Un seul analogue du facteur X (GDX-SFR, piste 12) ne permet pas la formation d'un complexe covalent détectable.

Toutes les formes activées des dérivés du facteur X (sauf le dérivé GDX-SFR) sont donc capables, en 20 présence d'héparine, de former un complexe covalent stable avec l'antithrombine, y compris le dérivé GDX-SVG, pourtant dénué de toute activité catalytique détectable.

La méthode retenue pour estimer la  $k_{on}$  de l'antithrombine pour la forme activée du dérivé du facteur X 25 dépend de la demi-vie des réactants. La méthode n'est pas la même selon que la demi-vie est supérieure à trois minutes, comprise entre 15 secondes et trois minutes ou inférieure à 15 secondes. La réaction doit être faite (sauf impossibilité, voir ci-dessous) en conditions de pseudo-premier ordre : 30 c'est-à-dire que la concentration de l'inhibiteur (l'antithrombine) doit être au minimum de 10 fois celle de sa cible (la forme activée du dérivé du facteur X). Par ailleurs, la concentration de la cible doit être suffisante pour pouvoir déetecter aisément son activité amidolytique 35 résiduelle (10 nM à 1  $\mu$ M selon la forme activée du dérivé du facteur X, de telle sorte qu'idéalement 10% du substrat chromogénique soit hydrolysé en 30 minutes). Ces deux contraintes limitent considérablement le choix de la

concentration des réactants : la concentration d'antithrombine doit être au minimum de 0,1 à 10  $\mu\text{M}$  (selon la cible). La demi-vie de la cible (égale au logarithme népérien de 2 divisé par le produit de la concentration de l'inhibiteur avec sa  $k_{on}$  pour la cible) détermine la méthode à utiliser. Pour des demi-vies supérieures à trois minutes, la méthode utilisée est la même que celle décrite pour l'estimation de la  $k_{on}$  du D-FFR-CK : elle consiste à déterminer l'activité résiduelle contenue dans des aliquotes prélevés à des temps variés, de façon à couvrir une dizaine de demi-vies. Pour des concentrations d'antithrombine comprises entre 0,1 et 10  $\mu\text{M}$ , cette approche ne permet d'estimer que des  $k_{on}$  au plus égales à  $2 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Lorsque la demi-vie de la réaction est inférieure à trois minutes, la mesure discontinue de l'activité résiduelle (par prélèvement d'aliquotes) devient difficilement praticable. Dans ce cas, toujours avec des concentrations d'antithrombine comprises entre 0,1 et 10  $\mu\text{M}$  (donc des  $k_{on}$  supérieures à  $2 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ), la réaction est suivie en continue grâce à la présence dans le milieu réactionnel de S2765. La vitesse d'hydrolyse du S2765 est directement proportionnelle à la concentration résiduelle de la forme activée du facteur X. Au temps zéro, l'activité amidolytique est maximale puisque aucune inhibition ne s'est encore produite. Si les conditions de pseudo-premier ordre sont respectées, la concentration de la forme activée du dérivé du facteur X diminue au cours du temps en suivant une exponentielle décroissante de premier ordre. La vitesse de clivage n'est pas constante : elle ralentit jusqu'à devenir nulle (lorsque la totalité de la cible a été neutralisée). On peut montrer (CHA, Biochem. Pharmacol., 24, 2177-2185, 1975; STONE & HOFSTEENGE, Biochemistry, 25, 4622-4628, 1986) que la quantité de pNA relarguée par l'hydrolyse du S2765 (donc l'absorbance à 405 nm du mélange réactionnel) augmente en suivant une exponentielle croissante de premier ordre qui peut être analysée par régression non-linéaire à l'aide de l'équation 4 :

$$A_{405} = A_0 + V_i (1 - \exp(-kt)) / k \quad (\text{Equation 4})$$

dans laquelle  $A_0$  représente l'absorbance initiale à 405 nm,  $V_i$  la vitesse d'hydrolyse du S2765 en l'absence d'antithrombine,  $I$  la concentration de l'antithrombine et  $k$  la constante de vitesse de pseudo-premier ordre de la réaction d'inhibition. Durant la réaction, l'inhibiteur est en compétition avec le substrat pour l'interaction avec l'enzyme, aussi, la valeur de la  $k_{on}$  de l'antithrombine pour la forme activée du dérivé du facteur X est liée à  $k$  par la relation :

$$10 \quad k_{on} = k (1+S/K_m) \quad (\text{Equation 5})$$

dans laquelle  $S$  représente la concentration initiale du substrat chromogénique (le S2765) et  $K_m$  sa constante de Michaelis pour la forme activée du dérivé du facteur X (déterminée lors de la caractérisation de l'activité amidolytique). Cette méthode permet de mesurer des demi-vies de l'ordre de 15 secondes, soit (pour des concentrations d'antithrombine comprises entre 0,1 et 10  $\mu\text{M}$ ) d'estimer des  $k_{on}$  au plus égales à  $2 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Pour des concentrations de formes activées des dérivés du facteur X comprises entre 10 nM et 1  $\mu\text{M}$ , lorsque la demi-vie de la réaction est inférieure à 15 secondes, l'amplitude du signal (l'absorbance à 405 nm) est trop faible pour permettre une mesure fiable en continue de l'activité résiduelle (augmenter la concentration de l'enzyme exigerait, d'augmenter celle de l'antithrombine pour respecter la condition de pseudo-premier ordre, donc à diminuer encore la demi-vie). Aussi, lorsque la  $k_{on}$  est supérieure à  $2 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , la réaction n'est plus faite en conditions de pseudo-premier ordre, mais en conditions de deuxième ordre. La condition de pseudo-premier ordre impose que la concentration de l'antithrombine reste (en apparence) constante durant toute la réaction; c'est le cas lorsqu'elle est en large excès par rapport à la cible. Si la concentration de l'inhibiteur est moins de dix fois supérieure à celle de sa cible, la diminution de la concentration de l'inhibiteur (par formation d'un complexe avec sa cible) ne peut plus être négligée. Durant la réaction, les concentrations de l'inhibiteur et de sa cible varient toutes deux au cours du temps, ce qui complique

5 singulièrement l'analyse. Il reste toutefois possible d'obtenir une amplitude du signal suffisante et de suivre la cinétique de l'inhibition en présence d'un substrat chromogénique en conditions de deuxième ordre. On peut 10 montrer que (dans ce cas) l'absorbance à 405 nm du mélange réactionnel augmente en suivant une courbe qui peut être analysée par régression non-linéaire à l'aide de l'équation 6, dite de "Slow tight-binding inhibition" (CHA, 1975, précité; Biochem. Pharmacol, 25, 2695-2702, 1976; WILLIAMS ET 15 MORRISON, Methods Enzymol, 63, 437-467, 1979) :

$$P = V_s t + (V_0 - V_s) (1-d) / (dk') \ln \{ (1-d \exp^{-k't}) / (1-d) \} \quad (\text{Equation 6})$$

15 dans laquelle  $P$  représente la concentration de pNA relarguée au temps  $t$  (directement proportionnelle à l'absorbance à 405 nm),  $V_0$  la vitesse d'hydrolyse du S2765 en l'absence de l'inhibiteur, et  $V_s$  la vitesse finale d'hydrolyse du S2765 (lorsque la réaction est terminée). Les paramètres  $d$  et  $k'$  sont eux mêmes fonction de deux paramètres ( $F_1$  et  $F_2$ ) tels que :

$$20 \quad d = (F_1 - F_2) / (F_1 + F_2);$$

$$k' = k F_2;$$

$$F_1 = K_I' + I + E;$$

$$F_2 = (F_1^2 - 4 EI)^{1/2}.$$

25 Dans ces relations,  $I$  représente la concentration initiale de l'antithrombine,  $E$  celle de la cible, et  $K_I'$  la constante d'inhibition apparente de l'interaction. La  $k_{on}$  de l'antithrombine pour la forme activée du dérivé du facteur X est liée à  $k$  (qui a la même signification que dans l'équation 4) par la relation donnée dans l'équation 5.

30 La méthode par prélèvements discontinus d'aliquotes est utilisée pour estimer la  $k_{on}$  de l'antithrombine pour la forme activée du dérivé GDX-AVG (en présence comme en absence d'héparine).

35 La réaction est faite en tampon cinétique contenant 1 mg/ml d'albumine bovine dépourvue de protéases (SIGMA, St Quentin-Fallavier, France) et éventuellement 2 unités par ml d'héparine (KORDIA). Dans un volume réactionnel de 10  $\mu$ l, une quantité suffisante de la forme

activée du dérivé GDX-AVG (0,5  $\mu$ M en présence d'héparine, 1  $\mu$ M en son absence) est incubée en présence d'un large excès d'antithrombine (5  $\mu$ M en présence d'héparine, 10  $\mu$ M en son absence), pendant un temps variable à 25°C. La même 5 expérience est recommandée une douzaine de fois, en variant le temps d'incubation d'une expérience à l'autre (de 10 secondes pour la première à 5 heures pour la dernière, de telle sorte que le temps d'incubation pour une expérience donnée soit égal au double de celui de la précédente). A 10 l'issue de chaque incubation, 190  $\mu$ l de S2765 (200  $\mu$ M en tampon cinétique) sont ajoutés, et l'activité amidolytique résiduelle est mesurée en enregistrant la variation de l'absorbance à 405 nm en fonction du temps (c'est-à-dire la vitesse initiale d'hydrolyse du S2765) à l'aide d'un lecteur 15 de microplaque MR5000. En traçant la vitesse d'hydrolyse du S2765 en fonction du temps d'incubation de l'inhibiteur avec sa cible, on obtient une courbe qui permet, par régression non-linéaire à l'aide de l'équation 2, d'estimer la constante de vitesse d'inactivation de la forme activée du dérivé du 20 facteur X. Les paramètres  $d_t$ ,  $d_0$  et  $d_{\min}$  de l'équation 2 représentant respectivement : l'activité résiduelle au temps  $t$ , l'activité initiale (qui est maximale), et l'activité à temps infini (qui est normalement nulle). Si la 25 condition de pseudo-premier ordre est respectée, la valeur obtenue pour  $k$  est égale à la concentration de l'inhibiteur multipliée par la  $k_{on}$  de la réaction d'inactivation de la forme activée du dérivé de facteur X.

La méthode par enregistrement en continu de l'absorbance à 405 nm dans des conditions de pseudo-premier ordre est utilisée pour estimer (en l'absence d'héparine) la  $k_{on}$  de l'antithrombine pour la forme activée du dérivé de facteur X dépourvu de domaine Gla, et celles des formes activées des dérivés GDX-IVG et GDX-IFG.

La cinétique est faite à 25°C, en tampon 35 cinétique contenant 1 mg/ml d'albumine bovine dépourvue de protéases, et suivie en continu grâce à la présence dans le milieu réactionnel de 100  $\mu$ M S2765. La réaction est faite en microplaque dans un volume de 200  $\mu$ l si l'amplitude du signal

permet de suivre la cinétique avec un lecteur de plaque. Dans le cas contraire, elle est faite en microcuvette dans un volume de 600  $\mu$ l en suivant la cinétique à l'aide d'un spectrophotomètre (LAMBDA 14, PERKIN-ELMER (Courtabœuf, France). La réaction est déclenchée par l'addition de 10 à 25 nM de la forme activée du dérivé de facteur X (idéalement de façon à ce qu'en absence d'inhibiteur, 10% du substrat chromogénique soit hydrolysé en 60 minutes). Pour chaque forme activée de dérivé du facteur X, la réaction est faite en présence de trois concentrations d'antithrombine, égales à 10, 20, et 40 fois la concentration de la cible. En traçant l'absorbance à 405 nm en fonction du temps, on obtient une courbe qui permet, par régression non-linéaire à l'aide de l'équation 4 (représentant une croissance exponentielle de premier ordre), d'estimer la constante de vitesse d'inactivation de la forme activée du dérivé du facteur X. Si la condition de pseudo-premier ordre est respectée, la  $k_{on}$  de l'antithrombine pour la forme activée du dérivé de facteur X est donnée par l'équation 5 qui prend en considération la compétition introduite par le substrat durant la cinétique.

En présence d'héparine, si les conditions de pseudo-premier ordre sont respectées, la demi-vie de la forme activée du dérivé du facteur X dépourvu de domaine Gla ainsi que celle des formes activées des dérivés GDX-IVG et GDX-IFG est inférieure à 15 secondes. Diminuer les concentrations de l'antithrombine et de sa cible permettrait de respecter la condition de pseudo-premier ordre tout en augmentant la demi-vie, mais réduirait l'amplitude du signal ; or, la sensibilité du spectrophotomètre devient insuffisante pour suivre une cinétique en continu lorsque l'amplitude n'est que de quelques milli-unités d'absorbance. En conséquence, la cinétique de l'inhibition par l'antithrombine en présence d'héparine de la forme activée du dérivé du facteur X dépourvu de domaine Gla ainsi que des formes activées des dérivés GDX-IVG et GDX-IFG est suivie en conditions de deuxième ordre.

La cinétique est faite à 25°C, en tampon cinétique contenant 1 mg/ml d'albumine bovine dépourvue de

protéases, et 2 unités par ml d'héparine; elle est suivie en continue grâce à la présence dans le milieu réactionnel de 400  $\mu\text{M}$  S2765. la réaction est faite en microcuvette dans un volume de 600  $\mu\text{l}$  en suivant la cinétique à l'aide d'un spectrophotomètre lambda 14. La réaction est déclenchée par addition du minimum de forme activée du dérivé de facteur X compatible avec un signal fiable (1 à 2,5 nM selon le dérivé, de façon à ce qu'en absence d'inhibiteur, environ 10% du substrat chromogénique soit hydrolysé en 60 minutes). Pour chaque forme activée de dérivé du facteur X, la réaction est faite en présence de deux concentrations d'antithrombine, égales à 2, et 3 fois la concentration de la cible. En traçant l'absorbance à 405 nm en fonction du temps, on obtient une courbe qui permet, par régression non-linéaire à l'aide de l'équation 6 d'estimer la constante de vitesse de deuxième ordre de la réaction. La  $k_{\text{on}}$  de l'antithrombine pour la forme activée du dérivé de facteur X est donnée par l'équation 5 qui prend en considération la compétition introduite par le substrat durant la cinétique.

Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau IX. Les valeurs de la  $k_{\text{on}}$  (en  $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ ) de l'antithrombine en présence d'héparine (+ héparine) ou en son absence (- héparine) sont indiquées, ainsi que l'erreur standard (exprimée en pourcentage de la valeur obtenue).

25

TABLEAU IX

Dérivé	$k_{\text{on}} (\text{M}^{-1} \text{s}^{-1})$	
	- héparine	+ héparine
GDX-FX	$1,2 \ 10^4 (\pm 4\%)$	$1,3 \ 10^7 (\pm 1\%)$
GDX-IVG	$5,8 \ 10^3 (\pm 3\%)$	$2,0 \ 10^7 (\pm 1\%)$
GDX-IFG	$1,8 \ 10^2 (\pm 2\%)$	$7,6 \ 10^5 (\pm 1\%)$
GDX-AVG	$10,0 (\pm 17\%)$	$3,0 \ 10^2 (\pm 6\%)$
GDX-IFR	ND	ND
GDX-SVG	ND	ND
GDX-SFR	ND	ND

En l'absence d'héparine, les valeurs de  $k_{\text{on}}$  de l'antithrombine pour la forme activée du dérivé du facteur X dépourvu de domaine Gla et la forme activée du dérivé GDX-IVG sont similaires (elles diffèrent au plus d'un facteur deux).

En comparaison, la valeur de la  $k_{on}$  de l'antithrombine pour la forme activée du dérivé GDX-IFG est 66 fois plus petite. Surtout, la valeur de la  $k_{on}$  pour la forme activée du dérivé GDX-AVG est plus de 1000 fois inférieure à celle de son homologue non muté (l'inhibition est en fait difficilement détectable). En présence d'héparine, la valeur de la  $k_{on}$  de l'antithrombine pour les dérivés activés du facteur X augmente de 1000 à 4000 fois, cependant que, même en présence d'héparine, la  $k_{on}$  de l'antithrombine pour la forme activée du dérivé GDX-AVG ne dépasse pas  $3 \cdot 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Cette observation importante, suggère qu'après activation, le dérivé GDX-AVG pourrait rester actif beaucoup plus longtemps que son homologue non muté (sa demi-vie plasmatique pourrait être de plusieurs heures en l'absence d'héparine, de 17 minutes en sa présence).

Demi-vie plasmatique de la forme activée des dérivés du facteur X :

La  $k_{on}$  de l'antithrombine pour la forme activée des dérivés du facteur X suggère que la demi-vie plasmatique de la forme activée du dérivé GDX-AVG pourrait être considérablement allongée, ce qui renforcerait son potentiel anti-hémophilique. Pour vérifier cette hypothèse, les Inventeurs ont déterminé la demi-vie plasmatique de la forme activée de chacun des dérivés du facteur X.

La demi-vie plasmatique des formes activées des dérivés du facteur X est estimée par la mesure de leur activité résiduelle après incubation pendant un temps variable dans un pool de plasmas humains normaux. Pour prévenir la formation d'un caillot, le pool de plasma est rendu incoagulable par l'addition de  $0,8 \mu\text{M}$  d'hirudine (80 unités par ml) avant d'être recalcifié (par l'addition de 8 mM  $\text{CaCl}_2$ ). Le mélange réactionnel se compose à 80% (v/v) de plasma et à 20% (v/v) de tampon cinétique contenant l'hirudine, le calcium, et la forme activée de l'un des dérivés du facteur X à une concentration suffisante pour permettre sa détection (20 à 300 nM final). Après des temps d'incubation variables, un aliquote (40  $\mu\text{l}$ ) est prélevé, et l'activité amidolytique résiduelle est mesurée, après avoir

ajouté 160  $\mu$ l de S2765 (1 mM pour la forme activée du dérivé GDX-AVG, 100  $\mu$ M pour les autres formes activées de dérivés du facteur X), en enregistrant la variation de l'absorbance à 405 nm en fonction du temps (la vitesse initiale d'hydrolyse du S2765) à l'aide d'un lecteur de microplaques MR5000. La constante de vitesse de la décroissance de l'activité est estimée par régression non-linéaire de la variation de l'activité résiduelle en fonction du temps à l'aide de l'équation 2 dans laquelle  $d_t$ ,  $d_0$  et  $d_{\min}$  représentent l'activité résiduelle au temps  $t$ , l'activité initiale (qui est maximale), et l'activité à temps infini (qui est minimale), respectivement. Bien que l'hirudine neutralise toute trace de thrombine, l'activité minimale n'est pas nulle même si la totalité de la forme activée du facteur X est neutralisée : ce bruit de fond provient d'autres protéases contenues dans le plasma, capables d'hydrolyser lentement le S2765. Si la condition de pseudo-premier ordre est respectée, la demi-vie plasmatique est égale au rapport du logarithme népérien de 2 sur  $k$  (la constante de vitesse de décroissance). La demi-vie plasmatique observée ne dépend ni de la concentration de la cible, ni de l'amplitude de l'activité amidolytique mesurée, elle ne dépend que de la concentration initiale de l'inhibiteur contenue dans le plasma (et, bien entendu, de sa réactivité vis-à-vis de la cible) : si l'antithrombine est bien le principal inhibiteur plasmatique en jeu, la condition de pseudo-premier ordre est respectée puisque durant toute l'incubation, elle reste en large excès (1,8  $\mu$ M) par rapport à sa cible.

Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau X. Les valeurs de la demi-vie (en minutes) de la forme activée des dérivés du facteur X en présence d'héparine (+héparine) ou en son absence (-héparine) sont indiquées ainsi que l'erreur standard (exprimée en pourcentage de la valeur obtenue). La demi-vie des formes activées de dérivés dépourvues d'activité amidolytique détectable n'a pas été déterminée (ND).

TABLEAU X.

Dérivé	Demi-vie (minutes)	
	- héparine	+ héparine
GD-FX	1,1 ( $\pm$ 2%)	<0,5
GDX-IVG	1,1 ( $\pm$ 19%)	<0,5
GDX-IFG	12,5 ( $\pm$ 5%)	<0,5
GDX-AVG	> 60	5,5 ( $\pm$ 19%)
GDX-IFR	ND	ND
GDX-SVG	ND	ND
GDX-SFR	ND	ND

En l'absence d'héparine, la demi-vie plasmatique de la forme activée du facteur X dépourvu de domaine Gla et de la forme activée du dérivé GDX-IVG sont comparables (une minute); en présence d'héparine, la demi-vie plasmatique de ces formes activées est trop courte pour être mesurée de façon fiable. En absence d'héparine, la demi-vie de la forme activée du dérivé GDX-AVG est remarquablement allongée : elle est 55 fois plus longue que celle de la forme activée du facteur X dépourvu de domaine Gla. L'accroissement de la demi-vie plasmatique en présence d'héparine est tout aussi remarquable puisque celle-ci est aisément mesurable (5 minutes et 30 secondes) contrairement à celle de son homologue non muté. La demi-vie plasmatique de la forme activée du dérivé GDX-IFG est également allongée (12 fois par rapport à celle de la forme activée du facteur X dépourvu de domaine Gla). La demi-vie plasmatique des autres formes activées de dérivés du facteur X (dénués d'activité amidolytique) ne peut pas être estimée par la méthode utilisée.

**EXEMPLE 6 : ACTIVITE ANTI-HEMOPHILIQUE DES DERIVES DU FACTEUR X**

L'activité procoagulante des formes activées des dérivés du facteur X a été testée dans des plasmas simulant une hémophilie A ou B sévère. Ces plasmas sont obtenus en déplétant un plasma normal en facteur VIII ou IX, et se comportent *in vitro* comme d'authentiques plasmas d'hémophiles. Les analogues du facteur X testés (GDX-IVG, GDX-IFG, GDX-AVG, GDX-IFR, GDX-SFR, GDX-SVG) sont tous dépourvus de domaine Gla. En plasma normal, l'action procoagulante du facteur X dépourvu de domaine Gla est très

inférieure à celle du facteur X normal, parce que le domaine Gla participe à l'activité du complexe prothrombinase.

L'activité procoagulante de ces dérivés du facteur X ne peut pas être comparable à celle du facteur X normal. En fait, tout dérivé de facteur X dépourvu de domaine Gla est un inhibiteur du complexe prothrombinase ; en effet, il entre en compétition avec la forme activée du facteur X plasmatique, qui, munie de son domaine Gla, est beaucoup plus active. En d'autres termes, dans un plasma normal, l'addition d'un quelconque dérivé de facteur X dépourvu de domaine Gla retarde la formation d'un caillot plutôt qu'il ne la favorise.

Le fait que l'activité procoagulante des dérivés dépourvus de domaine Gla soit très inférieure à celle du facteur X normal n'empêche cependant pas de comparer ces dérivés entre eux. En effet, la contribution du domaine Gla dans l'activité procoagulante est uniforme quelque soit le dérivé : elle est indépendante de son activité catalytique. Un dérivé du facteur X qui, par rapport au dérivé normal, diminue le "temps de coagulation" (temps nécessaire pour que le plasma perde sa fluidité) reflète donc une meilleure activité procoagulante; une augmentation du temps de coagulation indique au contraire que le dérivé est moins actif que son homologue normal. L'activité procoagulante des dérivés du facteur X (activés ou non) a donc été comparée avec celle de l'homologue normal dépourvu de domaine Gla (GD-FX).

Effet procoagulant des formes activées des dérivés du facteur X :

L'addition de la forme activée d'un dérivé du facteur X dans un plasma d'hémophile ne teste pas la cyclisation de l'activation de la prothrombine : elle ne reflète que la capacité du dérivé activé à fonctionner dans des conditions proches de celles rencontrées *in vivo*. En l'absence de facteur tissulaire et de facteur VIII ou IX, aucune amplification de la cascade de la coagulation n'a lieu, seule la forme activée du dérivé de facteur X permet la formation de thrombine et par suite la formation d'un

caillot. L'étude de l'activité au sein du complexe prothrombinase (cf. Exemple 5) montre que l'addition de facteur V activé restaure en partie l'activité catalytique de la forme activée de l'analogue GDX-AVG : elle n'est plus que 5 13 fois inférieure à celle de son homologue non muté (GDX-IVG). Cet effet est loin d'être aussi marqué avec les autres formes activées d'analogues du facteur X (GDX-IFG, GDX-IFR, GDX-SVG et GDX-SFR). L'utilisation de plasma déplété en facteur VIII ou IX permet d'étudier l'interférence éventuelle 10 avec d'autres facteurs de la coagulation, en particulier l'effet des mécanismes régulateurs (antithrombine etc..).

L'effet procoagulant de la forme activée des dérivés du facteur X est détecté par la capacité d'induire la formation d'un caillot dans un plasma déplété en facteur VIII 15 ou IX (DIAGNOSTICA STAGO, Asnières, France). En ajoutant du facteur tissulaire à l'un de ces plasmas, on peut déclencher la formation de suffisamment de thrombine pour induire la formation d'un caillot, mais le temps de coagulation est extrêmement long et ne peut être mesuré avec des méthodes 20 conventionnelles. Aussi, la réaction est faite en microplaqué, et la formation du caillot suivie en turbidimétrie, en enregistrant la densité optique à 405 nm en fonction du temps (quelle que soit la longueur d'onde, l'absorbance augmente avec la turbidimétrie). La formation du 25 caillot, relativement brutale, est précédée d'un temps de latence plus ou moins long : typiquement, la turbidimétrie suit une sigmoïde en fonction du temps. Le temps nécessaire pour atteindre 50% de la turbidimétrie maximale est 30 représentatif du "temps de coagulation" des tests classiques de la coagulation.

Dans la pratique, 100 µl de plasma déplété en facteur VIII ou IX sont préincubés en microplaqué à 25°C, et la réaction est déclenchée par l'addition de 100 µl de tampon cinétique contenant 20 mM CaCl<sub>2</sub> et 200 nM de dérivé activé du 35 facteur X. La variation de l'absorbance à 405 nm en fonction du temps est enregistrée à l'aide d'un lecteur de microplaqué MR5000. En traçant la variation de l'absorbance à 405 nm en fonction du temps, on obtient une courbe qui permet par

régression non-linéaire, d'estimer le temps de coagulation ( $V_{50}$ ) à l'aide de l'équation 7 dite de Boltzmann :

$$A_{405} = A_{\min} + (A_{\max} - A_{\min}) / (1 + e^{(V_{50} - t)/\text{pente}}) \quad (\text{Equation 7})$$

dans laquelle  $A_{405}$  représente l'absorbance à

5 405 nm au temps  $t$ ,  $A_{\min}$  l'absorbance initiale à 405 nm, et  $A_{\max}$  l'absorbance finale à 405 nm (après la formation du caillot). La pente est un paramètre qui tient compte de la relative brièveté de la phase ascendante lors de la formation du caillot (plus le temps de latence augmente, moins forte est 10 la pente).

Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau XI.

15 Le temps de coagulation (en minutes) d'un plasma déplété en facteur VIII (- facteur VIII) ou IX (- facteur IX) après addition de la forme activée de l'un des dérivés de facteur X est indiqué, ainsi que l'erreur standard (exprimée en pourcentage de la valeur obtenue). Au delà de 50 minutes, la valeur du temps de coagulation n'est plus fiable (>50)

TABLEAU XI

Dérivé	Temps de Coagulation (minutes)	
	- Facteur VIII	- Facteur IX
GD-FX	10,5 ( $\pm$ 1%)	6,5 ( $\pm$ 3%)
GDX-IVG	12,6 ( $\pm$ 3%)	6,7 ( $\pm$ 1%)
GDX-IFG	> 50	22,9 ( $\pm$ 1%)
GDX-AVG	10,9 ( $\pm$ 3%)	7,4 ( $\pm$ 3%)
GDX-IFR	> 50	> 50
GDX-SVG	> 50	> 50
GDX-SFR	> 50	> 50

20 La forme activée du dérivé GD-FX et celle du dérivé GDX-IVG ont un effet procoagulant marqué.

En outre, le potentiel de la forme activée du dérivé GDX-AVG est confirmé : en plasma déplété en facteur VIII ou IX, ce dérivé raccourcit autant le temps de coagulation que la forme activée du dérivé GD-FX. Il n'en est pas de même pour la forme activée du dérivé GDX-IFG : son activité procoagulante en plasma déplété en facteur IX est détectable, mais ce dérivé demeure incapable d'induire la formation d'un caillot en moins de 50 minutes dans un plasma déplété en facteur VIII. Les formes activées des dérivés du facteur X dépourvues d'activité catalytique détectable (GDX-

SFR, GDX-SVG et GDX-IFR) n'ont pas d'activité procoagulante détectable.

Effet procoagulant du dérivé GDX-AVG (non activé) :

Sans facteur tissulaire il n'y a pas de formation de caillot, et ceci que le plasma soit, ou non, celui d'un hémophile : la cascade de la coagulation n'est pas initiée. Un plasma normal coagule par contre très rapidement après l'addition de facteur tissulaire; celui d'un hémophile finit aussi par coaguler parce que le complexe extrinsèque de la coagulation (formé entre le facteur tissulaire et le facteur VIIa) active du facteur X, qui au sein du complexe prothrombinase (formé avec le facteur V activé) active de la prothrombine en thrombine, qui finit par cliver suffisamment de fibrinogène pour former un caillot. La réaction est beaucoup plus lente parce qu'il n'y a pas d'amplification passant par le complexe tenase. La présence d'un facteur X activable par la thrombine devrait rétablir une amplification de la génération de thrombine : deux activateurs seraient disponibles : le complexe du facteur tissulaire avec le facteur VIIa comme précédemment, mais aussi la thrombine. Au fur et à mesure que la concentration de thrombine augmente, de plus en plus de dérivés du facteur X sont activés, qui génèrent davantage de thrombine, d'où l'amplification.

Un dérivé de facteur X dépourvu de domaine Gla ne permet pas vraiment de tester son potentiel anti-hémophilique, car son action procoagulante est de toute façon limitée. Il est cependant possible de vérifier si, en présence d'un tel dérivé, une amplification de la formation de thrombine a lieu après addition de facteur tissulaire.

La méthode utilisée pour détecter l'effet procoagulant des dérivés (non-activés) du facteur X est très similaire à celle décrite pour la détection de l'activité de leurs formes activées. La principale différence est que la réaction est initiée par l'addition d'un mélange de facteur tissulaire et de phospholipides (outre que ces dérivés ne sont pas pré-activés). Comme pour l'étude des formes activées, la réaction est faite en microplaqué à 25°C, et la formation du caillot suivie en turbidimétrie, en enregistrant

la densité optique à 405 nm en fonction du temps. C'est la capacité des dérivés du facteur X à raccourcir le temps de coagulation d'un plasma déplété en facteur VIII ou IX qui est étudiée.

5 En pratique, le dérivé du facteur X (0,5 µM) est ajouté à 100 µl de plasma déplété en facteur VIII ou IX, et la réaction est déclenchée par l'addition de 100 µl de tampon cinétique contenant 20 mM CaCl<sub>2</sub> et 2 pM de facteur tissulaire recombinant mélangé à des phospholipides (INNOVIN, DADE 10 BEHRING, La Défense, France). La variation de l'absorbance à 405 nm en fonction du temps est enregistrée à l'aide d'un lecteur de microplaques MR5000, et le temps nécessaire pour atteindre la moitié de la turbidimétrie maximale est estimé par régression non-linéaire à l'aide de l'équation 7 comme 15 décrit ci-dessus pour l'étude de l'activité procoagulante des formes activées des dérivés de facteur X.

Les résultats obtenus avec le dérivé GDX-AVG (zymogène), sont illustrés par la Figure 4 qui compare l'effet procoagulant de ce dérivé (O) (non activé) avec le 20 dérivé GD-FX (□) (non activé) en plasma déplété en facteur VIII (4A) ou en facteur IX (4B). En présence du dérivé GDX-AVG, le temps de coagulation est plus court qu'en présence du dérivé GD-FX (aussi bien en plasma déplété en facteur VIII qu'en plasma déplété en facteur IX). La forme zymogène du 25 dérivé GDX-AVG a donc bien une action procoagulante, en dépit de l'absence de domaine Gla et de son activité catalytique réduite par rapport à son homologue non muté. Que le dérivé GDX-AVG soit plus actif que le dérivé GD-FX suggère qu'une amplification de la génération de thrombine a bien eu lieu en 30 présence de GDX-AVG. En effet, comparé au dérivé GD-FX, le dérivé GDX-AVG est 13 fois moins actif au sein du complexe prothrombinase, alors qu'il est au moins deux fois plus actif en plasma d'hémophile : il y aurait donc production d'au moins 26 fois plus de forme activée du dérivé GDX-AVG durant 35 la formation du caillot.

## REVENDICATIONS

1) Analogue de facteur X dans lequel la séquence Thr-Arg-Ile du site d'activation du facteur X natif est remplacée par une séquence clivable par la thrombine, 5 caractérisé en ce que ladite séquence clivable par la thrombine est la séquence Pro-Arg-Ala.

2) Analogue de facteur X selon la revendication 1, caractérisé en ce que la séquence Leu-Thr-Arg-Ile-Val-Gly du site d'activation du facteur X natif est remplacée par la 10 séquence P<sub>3</sub>-Pro-Arg-Ala-P<sub>2</sub>'-P<sub>3</sub>' dans laquelle P<sub>3</sub> représente un acide aminé quelconque, à l'exception de Pro, Asp, ou Glu, P<sub>2</sub>' représente Val, Ile, Leu, ou Phe, et P<sub>3</sub>' représente Gly, Asn, ou His.

3) Analogue de facteur X selon la revendication 15 2, caractérisé en ce que la séquence Leu-Thr-Arg-Ile-Val-Gly du site d'activation du facteur X natif est remplacée par la séquence Val-Pro-Arg-Ala-Val-Gly.

4) Analogue de facteur Xa susceptible d'être obtenu par clivage par la thrombine d'un analogue de 20 facteur X selon une quelconque des revendications 1 à 3.

5) Molécule d'acide nucléique codant pour un analogue de facteur X selon une quelconque des revendications 1 à 3, ou pour un analogue de facteur Xa selon la revendication 4.

25 6) Vecteur recombinant caractérisé en ce qu'il comprend une molécule d'acide nucléique selon la revendication 5.

7) Cellule hôte génétiquement transformée par une molécule d'acide nucléique selon la revendication 5.

30 8) Utilisation d'un analogue de facteur X selon une quelconque des revendications 1 à 3, d'un analogue de facteur Xa selon la revendication 4, ou d'une molécule d'acide nucléique selon la revendication 5, pour l'obtention d'un médicament procoagulant.

35 9) Utilisation selon la revendication 8, caractérisée en ce que ledit médicament est destiné au traitement d'une coagulopathie résultant d'un déficit en facteur VIII, en facteur IX, ou en facteur XI.

10) Utilisation selon la revendication 9,  
caractérisée en ce que ladite coagulopathie est l'hémophilie  
de type A ou l'hémophilie de type B.

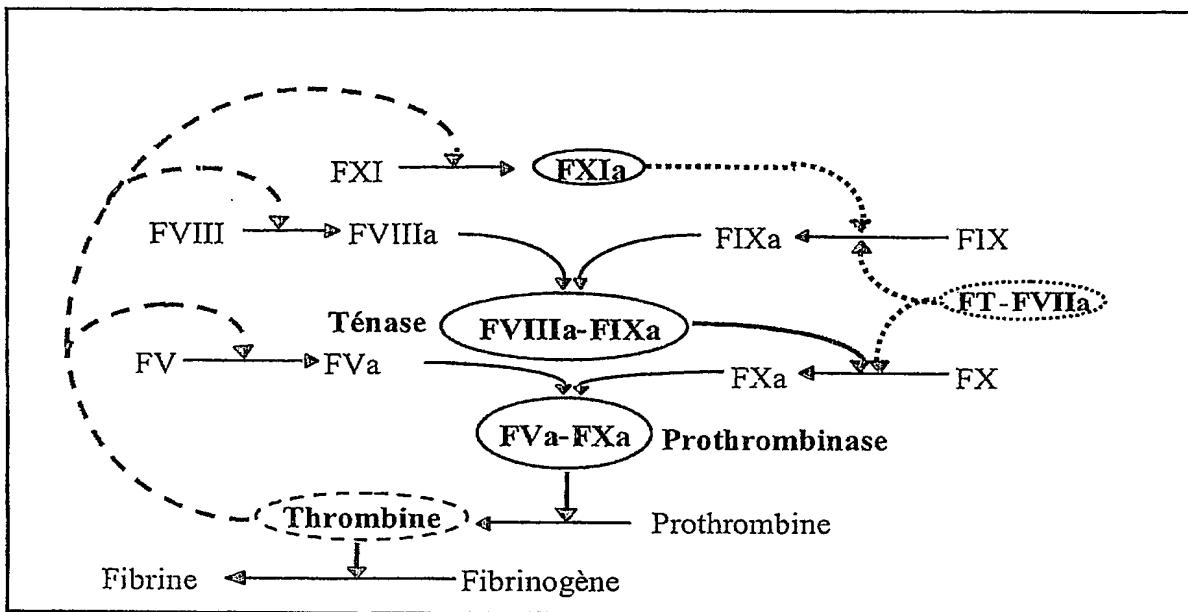


FIGURE 1

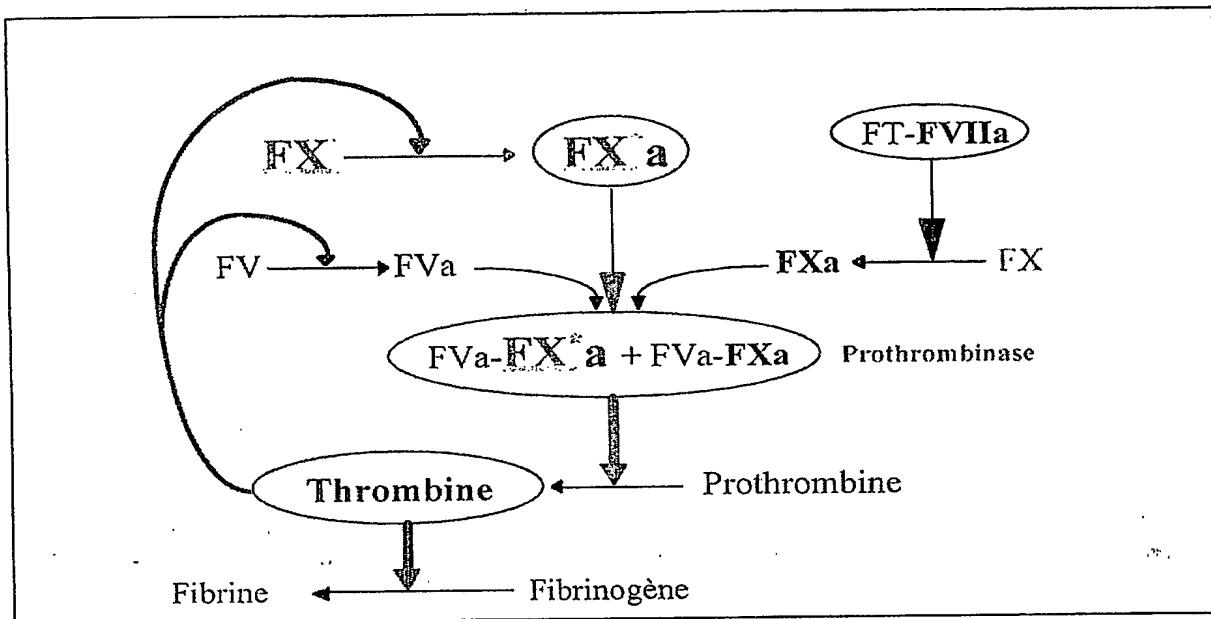


FIGURE 2

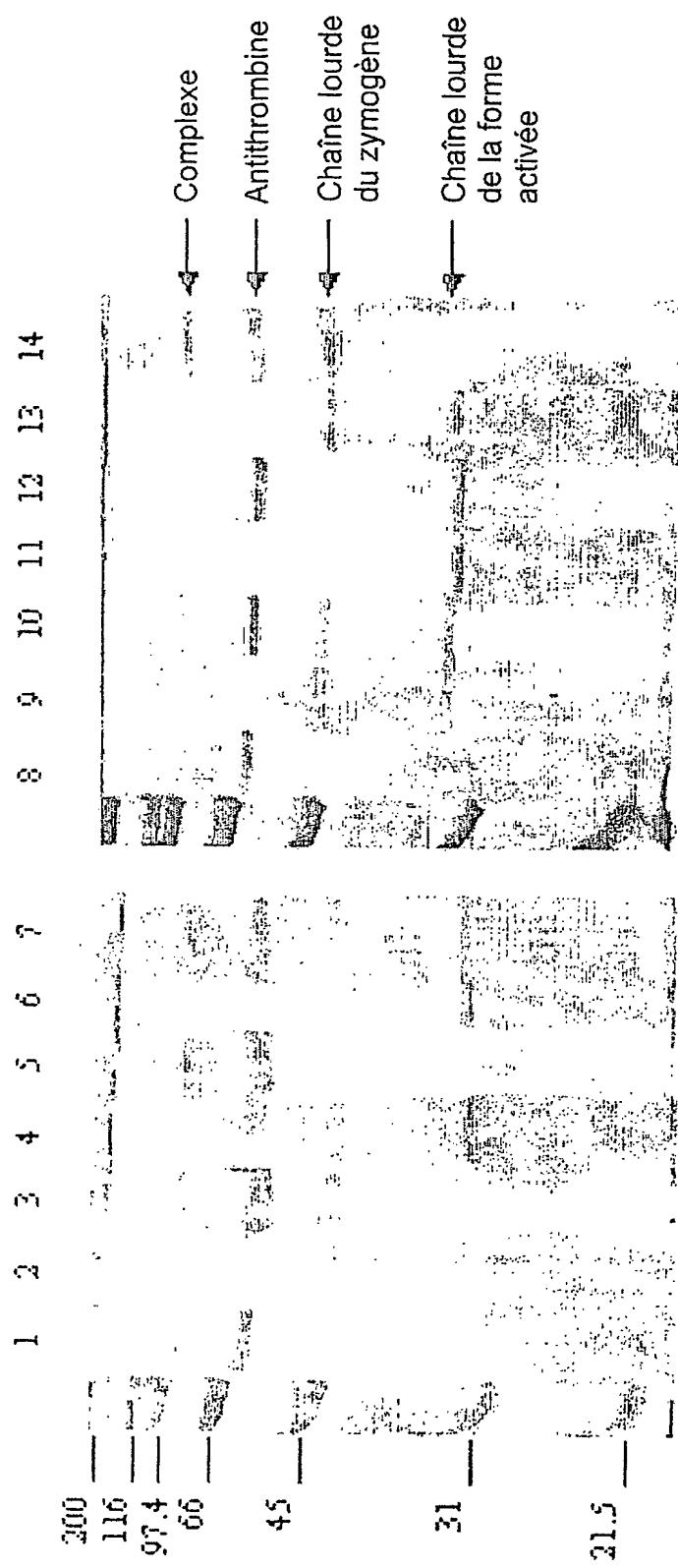
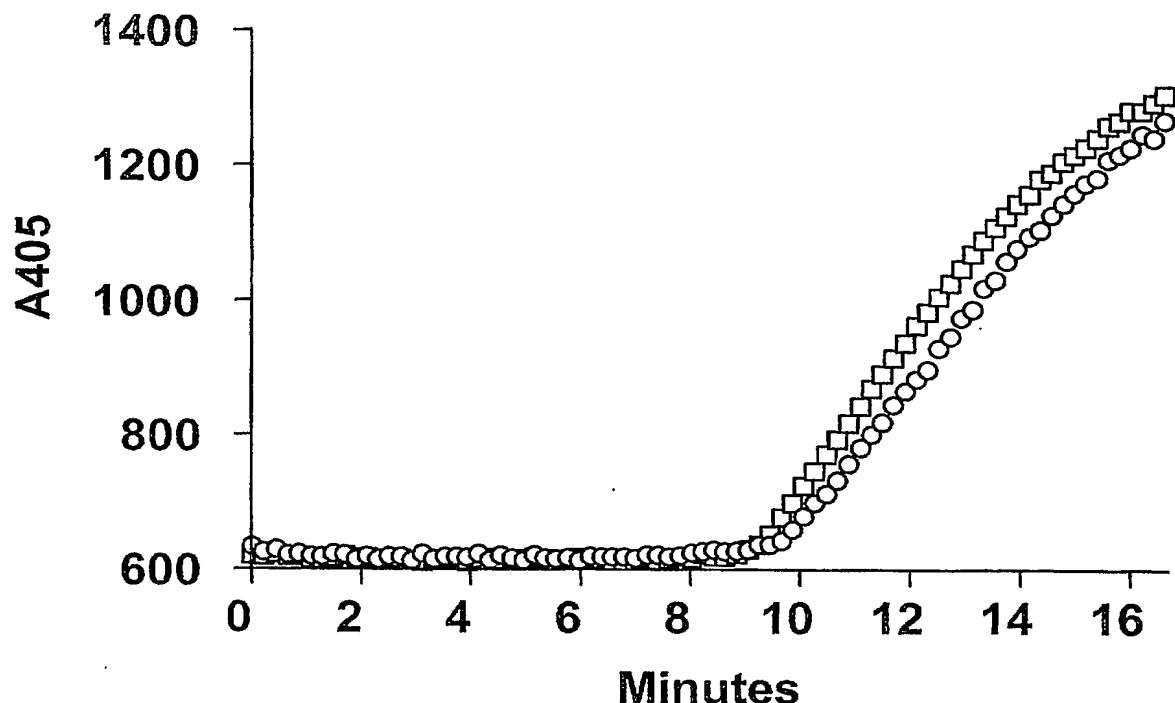


FIGURE 3

A



B

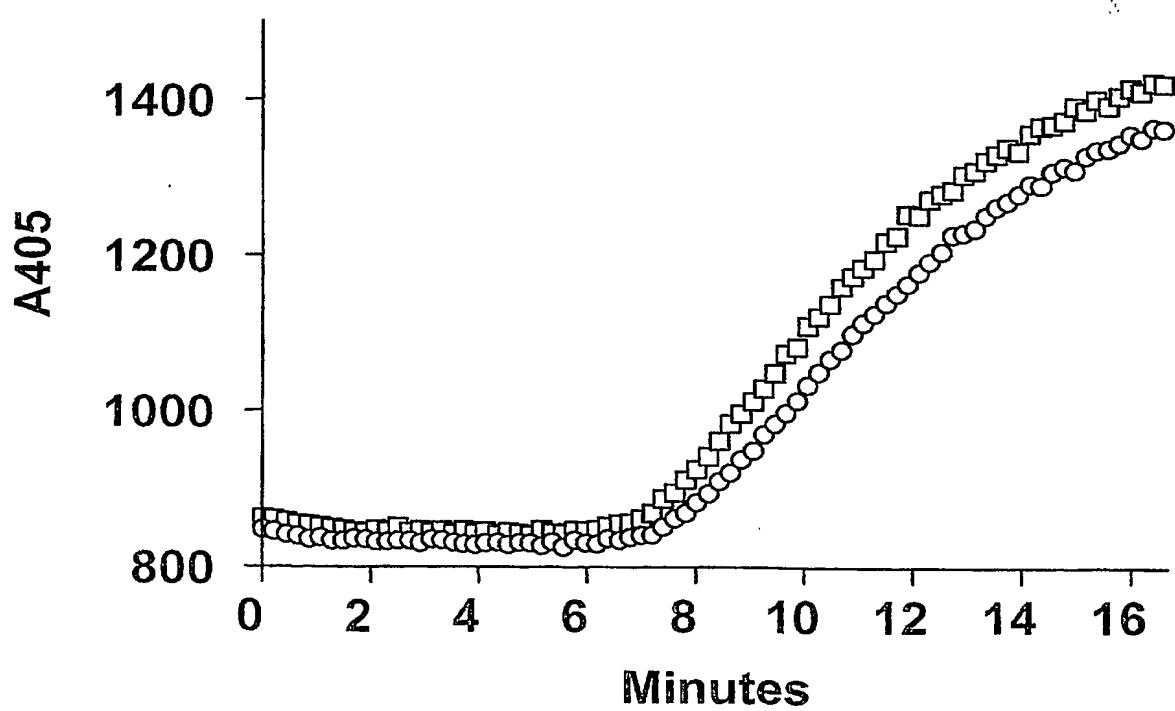


FIGURE 4

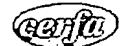
DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08  
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

  
N° 11235\*03

**INV**

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1.../2...

(À fournir dans le cas où les demandeurs et les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 GW / 270601

Vos références pour ce dossier (facultatif)	MJPah-F598/68FR
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL	0208299
<b>TITRE DE L'INVENTION</b> (200 caractères ou espaces maximum)	
Analogues de facteur X clivables par la thrombine.	

LE(S) DEMANDEUR(S) :

INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM)  
101, rue de Tolbiac  
75013 PARIS

DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :

[1] Nom	LOUVAIN Virginie	
Prénoms	Virginie	
Adresse	Rue	Résidence Carla 166, avenue de la Résistance
	Code postal et ville	92350 LE PLESSIS ROBINSON
Société d'appartenance (facultatif)		
[2] Nom	BIANCHINI	
Prénoms	Elsa	
Adresse	Rue	42-52, rue Villiers de l'Isle Adam
	Code postal et ville	75012 PARIS
Société d'appartenance (facultatif)		
[3] Nom	MARQUE	
Prénoms	Pierre-Emmanuel	
Adresse	Rue	7, rue Nicolas Houët
	Code postal et ville	75005 PARIS
Société d'appartenance (facultatif)		

S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.

DATE ET SIGNATURE(S)  
DU (DES) DEMANDEUR(S)  
OU DU MANDATAIRE  
(Nom et qualité du signataire)

Paris, le 11 Juin 2003



VIALLE-PRESLES Marie-José  
N° CPI 93-2009

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08  
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

**BREVET D'INVENTION**

**CERTIFICAT D'UTILITÉ**

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

  
N° 11235\*03

**DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 2.../2...**

(À fournir dans le cas où les demandeurs et les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 © W / 270501

**INV**

<b>Vos références pour ce dossier (facultatif)</b>		MJPah-F598/68FR
<b>N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL</b>		0208299
<b>TITRE DE L'INVENTION</b> (200 caractères ou espaces maximum)		
Analogues de facteur X clivables par la thrombine.		

**LE(S) DEMANDEUR(S) :**

INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM)  
101, rue de Tolbiac  
75013 PARIS

**DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :**

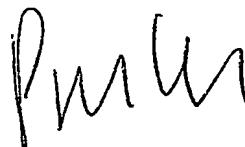
<b>1</b>	Nom		CALMEL-TAREAU
	Prénoms		Claire
Adresse	Rue		75 Bd de Charonne
	Code postal et ville		[7 5 0 1 1] PARIS
Société d'appartenance (facultatif)			
<b>2</b>	Nom		AIACH
	Prénoms		Martine
Adresse	Rue		70, rue Brancas
	Code postal et ville		[9 2 3 1 0] SEVRES
Société d'appartenance (facultatif)			
<b>3</b>	Nom		LE BONNIEC
	Prénoms		Bernard
Adresse	Rue		6, rue des Lyonnais
	Code postal et ville		[7 5 0 0 5] 75005 PARIS
Société d'appartenance (facultatif)			

S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.

**DATE ET SIGNATURE(S)**  
**DU (DES) DEMANDEUR(S)**  
**OU DU MANDATAIRE**  
**(Nom et qualité du signataire)**

Paris, le 11 Juin 2003

VIALLE-PRESLES Marie-José  
N° CPI 93-2009



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.